

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 03/040288 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12105

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Oktober 2002 (30.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 54 745.5 9. November 2001 (09.11.2001) DE
102 34 415.9 29. Juli 2002 (29.07.2002) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN,
Hans-Georg [DE/DE]; Sünderstr. 3, 51375 Lev-
erkusen (DE). SIEGMUND, Hans-Ulrich [DE/DE];
Quettinger Str. 167, 51381 Leverkusen (DE). IMM-
LER, Dorian [AT/DE]; Heymannstr. 38, 51373 Lev-
erkusen (DE). SCHUMACHER, Andreas [DE/DE];
Andreas-Gryphius-Strasse 7, 51065 Köln (DE). AURIEL,
Daniel [DE/DE]; Blumenthalstrasse 91, 50668 Köln (DE).(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AB, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des BerichtsZur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ISOTOPICALLY CODED AFFINITY MARKERS 3

(54) Bezeichnung: ISOTOPENCODIERTE AFFINITÄTSMARKER 3

(57) Abstract: The invention concerns isotopically coded affinity markers (ICAT) for mass spectrometric analysis of proteins, and
the preparation and use of said markers.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue, isotopencodierte Affinitätsmarker zur massenspektrometrischen Analyse von
Proteinen sowie deren Herstellung und deren Verwendung.

WO 03/040288 A2

Isotopencodierte Affinitätsmarker 3

Die Erfindung betrifft neue, isotopencodierte Affinitätsmarker zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen sowie deren Herstellung und deren Verwendung.

Die Proteomics-Technologie eröffnet die Möglichkeit, durch Analyse von biologischen Systemen auf der Proteinebene neue biologische Targets und Marker zu identifizieren. Es ist bekannt, dass von den im Genom codierten Proteinen nur jeweils ein bestimmter Teil aller möglichen Proteine exprimiert wird, wobei beispielsweise Gewebetyp, Entwicklungsstand, Aktivierung von Rezeptoren oder zelluläre Interaktionen die Expressionsmuster und -raten beeinflussen. Um Unterschiede der Expression von Proteinen in gesundem oder krankem Gewebe festzustellen, können verschiedene vergleichende Methoden zur Analyse von Protein-Expressionsmustern herangezogen werden ((a) S. P. Gygi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 9390; (b) D. R. Goodlett et al., Proteome Protein Anal., 2000, 3; (c) S. P. Gygi et al., Curr. Opin. Biotechnol., 2000, 11, 396).

Eine leistungsfähige Methode ist dabei die massenspektrometrische Detektion von Proteinen. Bei Verwendung von unterschiedlich isotopencodierten Affinitätsmarkern (ICAT® = Isotope Coded Affinity Tags) und Tandem-Massenspektrometrie kann dieses Verfahren zur quantitativen Analyse von komplexen Proteinmischungen herangezogen werden ((a) S. P. Gygi et al., Nature Biotechnology, 1999, 17, 994; (b) R. H. Aebersold et al., WO 00/11208). Das Verfahren beruht darauf, dass jede von zwei oder mehr zu vergleichenden Proteinmischungen, die in verschiedenen Zellzuständen erhalten worden sind, mit einem Affinitätsmarker anderer Isotopencodierung umgesetzt wird. Die Proteinmischungen werden danach kombiniert, gegebenenfalls fraktioniert oder proteolytisch behandelt und affinitätschromatographisch gereinigt. Nach Elution der gebundenen Fragmente werden die Eluate durch Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. Paare bzw. Gruppen von mit sich nur in der

Isotopencodierung unterscheidenden Affinitätsmarkern markierten Peptiden sind chemisch identisch und werden in der HPLC nahezu zeitgleich eluiert, sie unterscheiden sich im Massenspektrometer jedoch um die jeweiligen Molekulargewichtsdifferenzen aufgrund unterschiedlicher Isotopenmuster der Affinitätsmarker. Relative Proteinkonzentrationen können direkt durch Messungen der Peakflächen erhalten werden. Geeignete Affinitätsmarker sind Konjugate aus Affinitätsliganden, die über Brückenglieder kovalent mit proteinreaktiven Gruppen verknüpft sind. Dabei werden in die Brückenglieder unterschiedliche Isotope eingebaut. Das Verfahren wurde anhand von Affinitätsmarkern, in denen Wasserstoffatome durch Deuteriumatome ersetzt wurden ($^1\text{H}/^2\text{D}$ -Isotopencodierung), beschrieben.

Die im Stand der Technik beschriebene Methode mit $^1\text{H}/^2\text{D}$ -isotopencodierten Affinitätsmarkern weist verschiedene Nachteile auf, insbesondere eine(n) Isotopeneffekt der unterschiedlich markierten, aber ansonsten identischen Peptidfragmente im LC, nicht ausreichende Stabilität der Affinitätsmarker im allgemeinen und speziell im LC-MS/MS, mangelnde Effizienz der Avidin-Monomer-basierten Affinitätschromatographie, mangelnde Flexibilität beim Einbau der Isotopenmarkierungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung verbesserter isotopencodierter Affinitätsmarker.

Gegenstand der Erfindung sind organische Verbindungen, geeignet als Affinitätsmarker zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, der Formel (I),



in der

A für einen Affinitätsliganden-Rest oder für eine feste Phase,

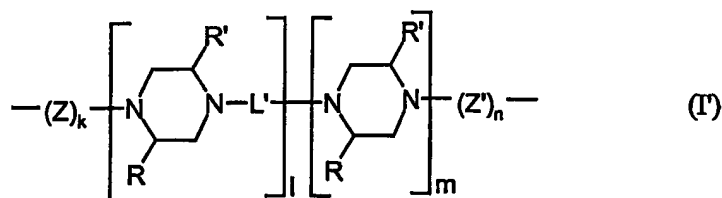
- 3 -

PRG für eine proteinreaktive Gruppe und

L für einen A und PRG kovalent verknüpfenden Linker steht,

wobei der Linker L eine Gruppe der Formel (I') enthält,

5



in der

10 Z der Aminosäure-Rest $\text{NH-CHR}^x\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO}$ mit der Aminosäure-Seitenkette R^x und der Zahl x aus dem Wertebereich von 0 bis 5 ist,

L' eine Brücke ist, die eine kovalente Verknüpfung zweier Piperazin-Reste ermöglicht oder erleichtert, oder im Falle von $l \geq 2$ gleiche oder
15 verschiedene solche Brücken sind,

R und R' an einem Piperazin-Ring unabhängig voneinander und unabhängig von anderen R und R' an anderen Piperazin-Ringen der gleichen oder der anderen der beiden Laufvariablen l und m jeweils eine α -Aminosäure-Seitenkette ist,
20

Z' der Aminosäure-Rest $\text{CO-(CH}_2\text{)}_y\text{-CHR}^y\text{-NH}$ mit der Aminosäure-Seitenkette R^y und der Zahl y aus dem Wertebereich von 0 bis 5 ist, der sich von Z in der unterschiedlichen Orientierung bezüglich der terminalen CO- und NH-Gruppe unterscheidet, und
25

- 4 -

k, l, m, n unabhängig voneinander jeweils für eine Zahl von 0 bis 10 stehen, wobei die Summe $k + l + m + n$ mindestens 1 und höchstens 40 beträgt,

oder deren Salze.

5

Die erfindungsgemäßen Affinitätsmarker weisen gegenüber dem Stand der Technik insbesondere folgende Vorteile auf:

10

Deuterium, ^{13}C - oder ^{13}C - und ^{15}N -markierte Glycin-Bausteine oder andere entsprechend markierte Aminosäurebausteine sind wohlfeile Edukte, die einen flexiblen Aufbau der isotoopenmarkierten Affinitätsmarker ermöglichen. In den in der Formel (I) beschriebenen Affinitätsmarker können in einfacher Weise mehr als zwanzig ^{13}C -Markierungen und zusätzlich bis zu zehn ^{15}N Isotope eingeführt werden. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Affinitätsmarkern mit einer

15

deutlich kleineren Massendifferenz ($\Delta M=8$) ist so auch die parallele Analyse mehrerer Proteom-Proben durch jeweilige Modifizierung mit Affinitätsmarkern mit verschiedenen Massendifferenzen möglich. Bevorzugt ist die Ausführung mit bis zu 4 unterschiedlich markierten Affinitätsmarkern, die die gleichzeitige Analyse und relative Quantifizierung von bis zu 4 komplexen Proteom-Proben ermöglicht.

20

Der modulare Aufbau der Affinitätsmarker ermöglicht eine flexible, den Erfordernissen des Arbeitsablaufs angepasste Kombination der einzelnen Bausteine.

25

Die beschriebenen Affinitätsmarker lassen sich mit einer säurelabilen Sollbruchstelle ausrüsten, die eine Dekomplexierung der Peptidfragmente durch eine wesentlich effizientere, beispielsweise auf Streptavidin oder oligomerem Avidin basierende Affinitätschromatographie für die Biotin-modifizierten Peptidfragmente oder durch eine reversible Anbindung an eine feste Phase ermöglicht. Weiterhin haben die nach Säurespaltung an den Peptidfragmenten verbleibenden Tags ein niedriges

30

Molekulargewicht und eine hohe Isotopendichte.

Die Handhabung der Affinitätsmarker wird durch verbesserte Löslichkeit, durch eine kristalline oder amorphe Erscheinungsart sowie durch erhöhte Stabilität verbessert.

5 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer oder mehrerer unterschiedlich isotonenmarkierter erfindungsgemäßer Verbindungen als Reagenz zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, insbesondere zur Identifikation von einem oder mehreren Proteinen oder Protein-Funktionen in einer oder mehreren Protein-haltigen Proben und zur Bestimmung der relativen Expressions-Niveaus von einem oder mehreren Proteinen in einer oder mehreren Protein-haltigen Proben.

10

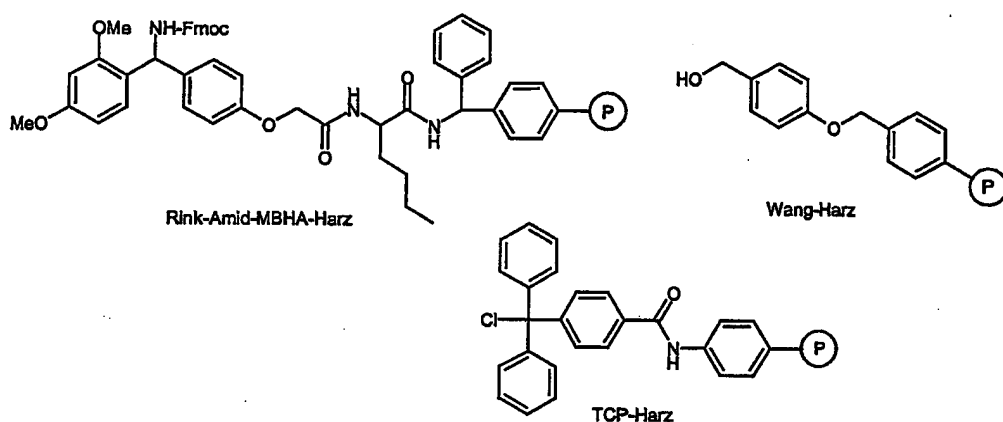
Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Kit zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, enthaltend als Reagenzien eine oder mehrere unterschiedlich isotonenmarkierte erfindungsgemäße Verbindungen.

15 Ein Affinitätsligand A dient zur selektiven Anreicherung von Proben mit Hilfe der Affinitätschromatographie. Die Affinitätssäulen sind mit den entsprechenden komplementären Partnern zu den Affinitätsliganden versehen, welche kovalente oder nicht kovalente Bindungen mit den Affinitätsliganden eingehen. Ein Beispiel für einen geeigneten Affinitätsliganden ist Biotin oder ein Biotin-Derivat, das mit den
20 komplementären Peptiden Avidin oder Streptavidin starke, nicht kovalente Bindungen eingeht. Auf diese Weise können zu untersuchende Proben mit Hilfe der Affinitätschromatographie selektiv aus Probenmischungen isoliert werden. Im gleichen Sinn können beispielsweise auch Kohlenhydrat-Reste, die nicht kovalente Wechselwirkungen mit beispielsweise fixierten Lektinen eingehen können, als
25 Affinitätsligand verwendet werden. Weiterhin kann im gleichen Sinn die Wechselwirkung von Haptenen mit Antikörpern oder die Interaktion von Übergangsmetallen mit entsprechenden Liganden als Komplexbildner genutzt werden oder andere Systeme die miteinander in Wechselwirkung treten.

30 Alternativ kann die gezielte Abreicherung auch durch selektive, reversible Anbindung an eine entsprechend funktionalisierte feste Phase A erreicht werden.

- 6 -

Geeignete feste Phasen sind beispielsweise Amino-funktionalisierte Harze auf Kieselgel-Basis und weiterhin von den als Festphasen-Synthesen durchgeführten Peptid-Synthesen her bekannt, wie etwa Tritylharz, auf Benzylalkohol-Trägerung basierendes Sasrin-Harz, auf Benzylalkohol-Trägerung basierendes Wang-Harz, Wang-Polystyrol-Harz, Rink-Amid-MBHA-Harz oder TCP (Tritylchlorid-Polystyrol)-Harz (in den abgebildeten Formeln steht das eingekreiste P jeweils für den Rest des Harzes):



10

Bevorzugt ist als feste Phase A ein polymerer Träger, insbesondere ein modifiziertes natürliches oder synthetisches Harz, beispielsweise ein Harz auf Kieselgel- oder Polyethylenglykol-Basis, mit zur Anbindung des Linker L geeigneten funktionellen Gruppen, beispielsweise Hydroxy-, Carboxy- und Aminogruppen, insbesondere Aminogruppen. Besonders bevorzugt ist als feste Phase A ein Amino-funktionalisiertes Harz auf Kieselgel-Basis, beispielsweise ein Aminopropyl-Kieselgel, wie es z. B. von der Fa. Aldrich unter der Nummer 36425-8 vertrieben wird.

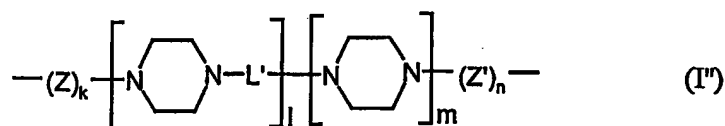
20

Proteinreaktive Gruppen PRG dienen der gezielten Markierung der Proteine an ausgewählten funktionellen Gruppen. PRGs haben eine spezifische Reaktivität für endständige funktionelle Gruppen der Proteine. Aminosäuren als Elemente von Proteinen, die häufig für gezielte Markierungen verwendet werden, sind beispielsweise Mercaptoaminomonocarbonsäuren wie Cystein, Diaminomo-

carbonsäuren wie Lysin oder Arginin oder Monoaminodicarbonsäuren wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Weiterhin können proteinreaktive Gruppen auch phosphatreaktive Gruppen wie beispielsweise Metallchelate sowie aldehydreaktive und ketonreaktive Gruppen wie beispielsweise Semicarbazone oder auch Amine mit nachfolgender Behandlung durch Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid sein. Ebenso können es Gruppen sein, die nach einer gezielten Proteinderivatisierung wie beispielsweise einer Bromcyanspaltung oder einer Elimination von Phosphatgruppen etc. mit den Umsetzungsprodukten reagieren.

Z und Z' sind Reste gleicher oder verschiedener Aminosäuren. Bevorzugt sind Reste von L- α -Aminosäuren, insbesondere der 20 natürlichen proteinogenen Aminosäuren ($x = 0$ bzw. $y = 0$), beispielsweise Glycin-Reste, und Reste von ω -Aminosäuren, wie beispielsweise $\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-CO}$ und $\text{CO}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}$. Die Aminosäuren können dabei gegebenenfalls in der D-, L- oder racemischen Form vorliegen.

Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der Formel (I) weisen im Linker L als Gruppe der Formel (I') eine Gruppe der Formel (I'') auf (alle R und R' in Formel (I') sind Wasserstoff):



Ebenfalls bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der Formel (I) weisen im Linker L eine Gruppe der Formel (I'), insbesondere eine Gruppe der Formel (I'') auf, in der Z der Glycin-Rest $\text{NH-CH}_2\text{-CO}$ oder Z' der Glycin-Rest $\text{CO-CH}_2\text{-NH}$ ist, insbesondere in der Z der Glycin-Rest $\text{NH-CH}_2\text{-CO}$ und Z' der Glycin-Rest $\text{CO-CH}_2\text{-NH}$ ist.

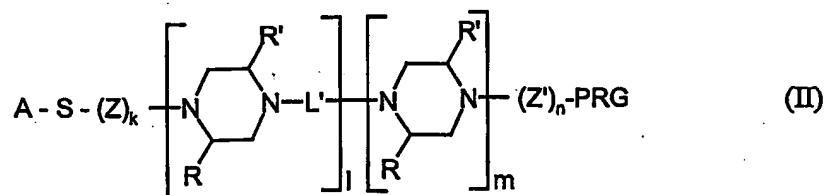
- 8 -

In einer weiteren Ausführungsform sind Linker L bevorzugt, die eine Sollbruchstelle S wie z. B. eine säurelabile Funktionalität besitzen, die unter bestimmten Bedingungen beispielsweise unter Säureeinwirkung eine Spaltung des Affinitätsmarkers gewährleisten, um so z. B. die Freisetzung von der Affinitätssäule zu erleichtern, oder den am Peptid verbleibenden Rest zu verkleinern oder die Arbeitsabläufe insgesamt effizienter zu gestalten. Anstelle einer säurelabilen Sollbruchstelle kann die Spaltung der Linker L auch auf andere Art und Weise herbeigeführt werden, beispielsweise durch chemische Spaltung von u.a. Silylethern, Estern, Carbamaten, Thioestern, Acetalen, Disulfiden oder Schiff'schen Basen, weiterhin durch photochemische Spaltung, oder durch enzymatische Spaltung von Estern, Amiden, Nucleotiden oder Glycosiden oder durch thermische Spaltung beispielsweise von interagierenden Nukleinsäuresträngen.

Zur Verbesserung der Löslichkeit der erfindungsgemäßen Affinitätsmarker können vorhandene saure und/oder basische funktionelle Gruppen in Form ihrer Salze, bevorzugt ihrer Hydrochloride, Acetate, Trifluoracetate, Alkalimetall-Salze oder Ammonium-Salze, hergestellt und eingesetzt werden.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung weist die proteinreaktive Gruppe PRG löslichkeitsverbessernde funktionelle Gruppen auf.

Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind solche der Formel (I), insbesondere der Formel (II),



bei denen eine oder mehrere der Gruppen A, PRG, S, Z, L', Z' und k, l, m, n, insbesondere alle diese Gruppen, gemäß den nachfolgenden Definitionen ausgewählt sind:

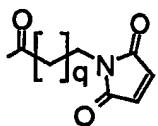
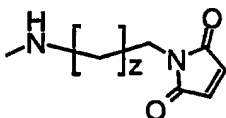
5 A steht für den Acylrest eines Affinitätsliganden, beispielsweise Biotinyl oder ein Biotin-Derivat, oder für eine mit einem polymeren Träger verbundene funktionelle Gruppe, beispielsweise eine trägergebundene Hydroxy-, Carboxy- oder Aminogruppe, insbesondere eine trägergebundene Amino-

10 gruppe.

PRG steht für den Rest einer proteinreaktiven Gruppe, die charakterisiert ist durch eine elektrophile Gruppe und eine geeignete Brücke, die die Anbindung der elektrophilen Gruppe

15 an Z' ermöglicht oder erleichtert. Weiterhin kann eine solche Gruppe durch entsprechende Ausführung beispielsweise auch die Löslichkeit verbessern. Eine bevorzugte proteinreaktive Gruppe ist ein Epoxid, eine Maleinimidogruppe, ein Halogen oder ein Acrylrest, insbesondere verbrückte Elektrophile wie

20

mit $q = 0-4$,mit $z = 0-5$,mit $r = 1-10$,

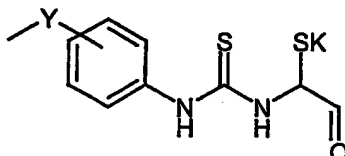
25

Weiterhin kann PRG eine andere bekannte proteinreaktive Gruppe sein, wie sie z. B. von W.H. Scouten in *Methods in Enzymology*, Volume 135, edited by Klaus Mosbach,

- 10 -

AcademicPress Inc. 1987, S. 30ff beschrieben und zusammengefasst wurden.

S steht für eine säurelabile Sollbruchstelle, wie beispielsweise



mit Y als Abstandhalter mit bevorzugt 1-10, insbesondere 1-5, Nicht-Wasserstoff-Atomen, der die Anbindung des Arylrestes an den Affinitätsliganden oder an den polymeren Träger ermöglicht oder erleichtert, besonders bevorzugt NH, NH-CH₂, NH-CH₂-CH₂-NH-CO, CH₂-CO, wobei Y ortho-, meta- und para-ständig zu NH stehen kann und die para-Stellung bevorzugt ist,

und mit SK als Seitenketten-Rest einer α -Aminosäure der Formel SK-CH(NH₂)-COOH, die für andere SK als ein H-Atom in der D-, L- oder racemischen Form vorliegen kann, beispielsweise die Seitenketten der 20 natürlichen Aminosäuren sowie deren D-Formen und Racemate.

Z ist der Rest einer Aminosäure, insbesondere der Rest von Glycin, der nicht markiert oder ¹³C- oder ¹⁵N-Markierungen, oder eine Kombination dieser Markierungen enthalten kann.

L' ist eine Brücke, die eine kovalente Verknüpfung zweier Piperazin-Reste ermöglicht oder erleichtert. L' ist vorzugsweise aus den Bausteinen Alkylen, insbesondere (CH₂)_n, Alkenylen, Alkinylen, Arylen, CO, CS und NH aufgebaut, insbesondere aus

einer Anzahl von 2 bis 10 solcher Bausteine. L' kann weitere Aminosäure-Reste wie Z und Z', insbesondere Glycin-Reste, enthalten, die gegebenenfalls ^{13}C - oder ^{15}N -Isotopenmarkierungen oder eine Kombination dieser Markierungen enthalten können, und ist bevorzugt eine Brücke ausgewählt aus CO-CO, CO-(CH₂)_s-CO sowie CO-Arylen-CO, CO-CH₂-NH-CO-NH-CH₂-CO, CO-NH-CH₂-CO, CO-CH₂-NH-CO, CO-CH₂-NH-CO-CO-NH-CH₂-CO, CO-CH₂-NH-CO-(CH₂)_s-CO-NH-CH₂-CO, CO-CH₂-NH-CO-Arylen-CO-NH-CH₂-CO, (CH₂)_s-NH-CO-CO-NH-(CH₂)_s, (CH₂)₃-NH-CO-CO-NH-(CH₂)₃, (CH₂)_s-CO, (CH₂)₂-CO, CO und CS ist, wobei s bevorzugt eine ganze Zahl zwischen 1 und 6, beispielsweise 2, 3, 4 oder 5.

R und R' an einem Piperazin-Ring sind jeweils gleiche Aminosäure-Seitenketten, insbesondere Wasserstoff, sind vorzugsweise an allen Piperazin-Ringen einer der beiden Laufvariablen l und m gleiche Aminosäure-Seitenketten, insbesondere Wasserstoff, und sind besonders bevorzugt an allen Piperazin-Ringen gleiche Aminosäure-Seitenketten, insbesondere Wasserstoff.

Z' ist der Rest einer Aminosäure, insbesondere der Rest von Glycin, der sich von Z in der unterschiedlichen Orientierung bezüglich der terminalen CO- und NH-Gruppe unterscheidet; er kann nicht markiert sein oder ^{13}C -, oder ^{15}N -Markierungen, oder eine Kombination dieser Markierungen enthalten.

k, l, m, n können unabhängig voneinander jeweils für Zahlen zwischen 0 und 10 stehen, wobei die Summe von k + l + m + n bevorzugt größer als 0 und kleiner als 20 ist und besonders bevorzugt kleiner als 10 ist. Vorzugsweise steht m für die Zahl 0 oder 1.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung haben Alkyl, Alkylen, Alkenylen, Alkinylen, Alkoxy und Arylen, soweit nicht anders spezifiziert, die folgende Bedeutung:

5

Alkyl per se und "Alk" und "Alkyl" in Alkylen, Alkenylen, Alkinylen und Alkoxy stehen für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit in der Regel 1 bis 6, vorzugsweise 1 bis 4, besonders bevorzugt 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, beispielhaft und vorzugsweise für Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, tert.-Butyl, n-Pentyl und n-Hexyl.

10

Alkylen, Alkenylen und Alkinylen stehen für bivalente Alkylgruppen, die im Falle von Alkenylen bzw. Alkinylen eine, zwei, drei, vier, fünf oder mehr Doppel- bzw. Dreifachbindungen und dementsprechend mindestens 2 Kohlenstoffatome aufweisen, beispielsweise und vorzugsweise für Methylen, Ethylen, Ethenylen, Ethinylen, n-Propylen, iso-Propylen, n-Propenylen, Methylethylen und Propinylen.

15

Alkoxy steht beispielhaft und vorzugsweise für Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, Isopropoxy, tert.-Butoxy, n-Pentoxy und n-Hexoxy.

20

Arylen steht für einen bivalenten mono- bis tricyclischen aromatischen, carbocyclischen Rest mit in der Regel 6 bis 14 Kohlenstoffatomen; beispielhaft und vorzugsweise für Phenylen, Naphthylen und Phenanthrenylen.

25

Eine gegebenenfalls in einer Aminosäure-Seitenkette R, R', R^x, R^y oder SK vorliegende Drittfunktion von Aminosäuren kann optional frei oder mit einer Schutzgruppe geschützt vorliegen. In einer besonderen Ausführungsform tragen die Seitenketten, insbesondere SK, zur verbesserten Löslichkeit der Affinitätsmarker bei.

30

Die nicht-isotopenmarkierten Verbindungen stellen bereits eine Isotopencodierung dar. Zur weiteren Isotopencodierung werden die erfindungsgemäßen Verbindungen

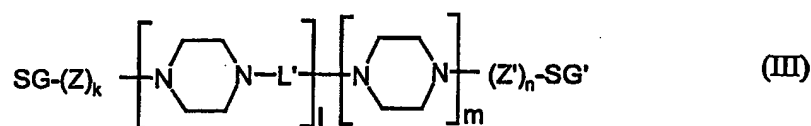
- 13 -

vorzugsweise mit mindestens einem Kohlenstoff-Atom des Isotops ^{13}C , insbesondere vier bis 20 ^{13}C -Atomen, isotypenmarkiert. Der mit $^1\text{H}/^2\text{D}$ -isotypenmarkierten Affinitätsmarkern beobachtete nachteilige Isotopeneffekt in der LC ist bei $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotypenmarkierung deutlich verringert oder sogar gar nicht ausgeprägt. Alternativ oder zusätzlich können zur Markierung auch die Isotope ^2D , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O und/oder ^{34}S eingesetzt werden.

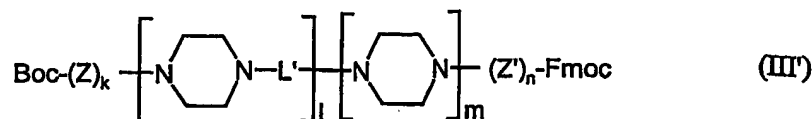
In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden ^{13}C -markierte Verbindungen zusätzlich mit mindestens einem Stickstoff-Atom des Isotops ^{15}N , vorzugsweise ein bis zehn ^{15}N -Atomen, insbesondere ein bis drei ^{15}N -Atomen, isotypenmarkiert.

Die Isotypenmarkierungen werden üblicherweise in L und/oder PRG vorgenommen, vorzugsweise in L und dort insbesondere in den Gruppen Z, L', Z' und/oder in den Piperazin-Bausteinen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise hergestellt werden, indem zunächst ein mit geeigneten orthogonalen Schutzgruppen SG und SG' geschütztes Intermediat der Formel (III),

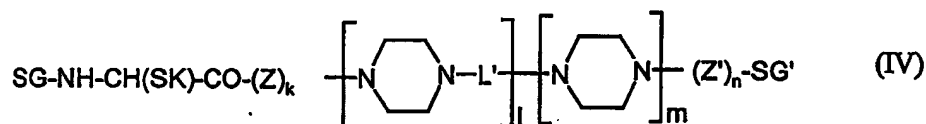


beispielsweise mit der Boc- und der Fmoc-Gruppe gemäß Formel (III'),



hergestellt wird. Die Synthese dieser Intermediate verläuft nach klassischen Methoden der Peptidchemie wie sie dem Fachmann bekannt sind, und wie sie beispielsweise in Houben-Weyl; Methoden der Organischen Chemie; Vierte Auflage; Band XV Teil 1 und 2; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974, oder in Hans-Dieter Jakubke and Hans Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie, Weinheim 1982 beschrieben wurden.

Aus diesen Intermediaten wird erneut nach Standardreaktionen zunächst die Schutzgruppe SG abgelöst und anschließend gegebenenfalls ein weiteres Aminosäurederivat, das eine zu der abgelösten gleiche oder verschiedene Schutzgruppe SG, insbesondere eine Boc-Gruppe, an der α -Aminofunktion trägt, angeknüpft, wobei Derivate der Formel (IV) erhalten werden. Gegebenenfalls in SK vorliegende Drittfunktionen können optional geschützt oder frei vorliegen. Optional vorhandene Schutzgruppen können permanent erhalten bleiben oder in separaten Deblockierungsschritten oder gleichzeitig mit der Abspaltung einer der terminalen Schutzgruppen abgelöst werden.



Anschließend kann aus (IV) die Schutzgruppe SG', beispielsweise eine Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF, abgelöst werden, so dass im nächsten Schritt die Kupplung mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe der Formel

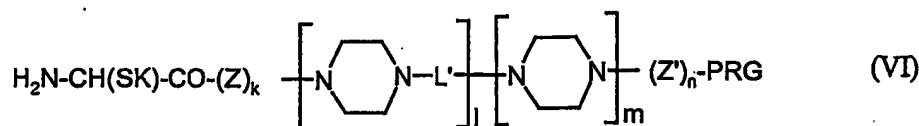


mit U einer Gruppe, die die Verknüpfung von PRG mit Z' oder gegebenenfalls mit einer anderen Endgruppe von L ermöglicht, indem sie zum Beispiel zu einer Abgangsgruppe wird, erfolgen kann. Beispiele für solche Gruppen sind aktivierte

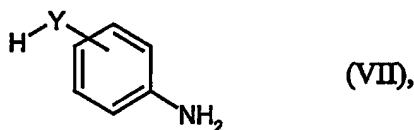
- 15 -

Ester wie z. B. N-Hydroxysuccinimid-ester oder Chloride oder Gruppen, aus denen während der Kupplung eine Abgangsgruppe generiert werden kann.

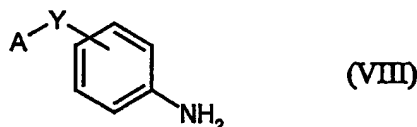
5 In einem weiteren Schritt wird dann die terminale Schutzgruppe SG abgelöst, wobei ein Konjugat der Formel (VI) erhalten wird.



10 Parallel dazu wird ein Affinitätsligand A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form desselben wie beispielsweise ein aktivierter Ester, ein Säurechlorid oder ähnliches, oder eine Hydroxy-, Carboxy- oder Amino-funktionalisierte feste Phase A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form davon unter geeigneten Kupplungsbedingungen mit einer Verbindung



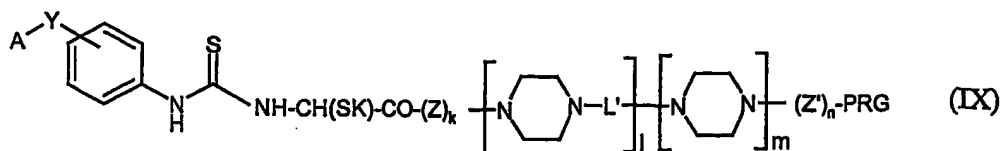
15 die optional auch eine Schutzgruppe tragen kann, zum Derivat



20 umgesetzt. Das Derivat (VIII) wird dann ggf. nach vorheriger Abspaltung einer optional eingeführten Schutzgruppe mit aktivierten Kohlensäurederivaten wie Thiophosgen oder Thiocarbonylbisimidazol in ein entsprechendes Isothiocyanat überführt und anschließend mit (VI) zum Thioharnstoff (IX) gekuppelt.

25

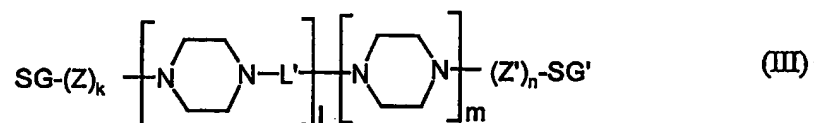
- 16 -



Beispielsweise kann die Aminofunktion an Harzen zunächst mit Fmoc-geschützter p-Aminobenzoesäure oder mit Fmoc-geschützter p-Amino-phenylelessigsäure umgesetzt werden, anschließend die Fmoc-Gruppe abgelöst und mit einem aktivierten Kohlensäurederivat in das Isothiocyanat überführt und zum Thioharnstoff umgesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demgemäß ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß Anspruch 1, bei dem

- i) ein geschütztes Intermediat der Formel (III),

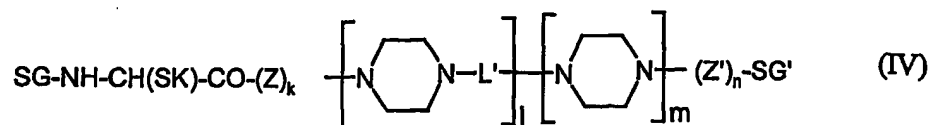


in der SG und SG' für zwei orthogonale Schutzgruppen stehen,

hergestellt wird,

- ii) aus dem Intermediat der Formel (III) zunächst die Schutzgruppe SG abgelöst wird und anschließend ein weiteres Aminosäurederivat, das eine zu der abgelösten gleiche oder verschiedene Schutzgruppe SG an der α -Aminofunktion trägt, angeknüpft wird, wobei ein Derivat der Formel (IV),

- 17 -

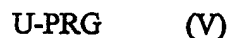


in der SK für die Seitenkette einer Aminosäure steht,

5 erhalten werden,

- iii) nach Ablösung der Schutzgruppe SG' aus dem Derivat der Formel (IV) mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe der Formel (V),

10



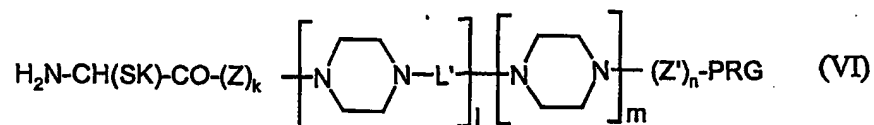
in der U für eine Gruppe steht, die die Verknüpfung von PRG mit Z' oder gegebenenfalls mit einer anderen Endgruppe von L ermöglicht,

15

umgesetzt wird,

- iv) die terminale Schutzgruppe SG abgelöst wird, wobei ein Konjugat der Formel (VI)

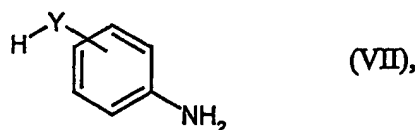
20



erhalten wird,

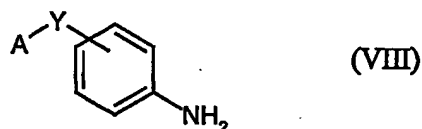
- 18 -

- v) ein Affinitätsligand A-OH oder A-NH₂ oder eine Hydroxy-, Carboxy- oder Amino-funktionalisierte feste Phase A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form davon mit einer Verbindung der Formel (VII),



in der Y für die optional verzweigte Abstandhaltergruppe steht,

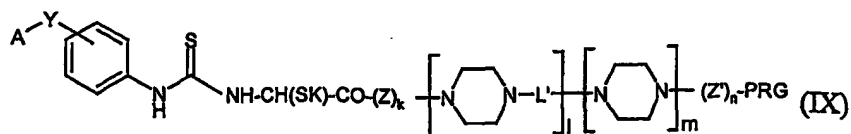
die optional eine Schutzgruppe tragen kann, zum Derivat der Formel (VIII)



umgesetzt wird,

- vi) das Derivat der Formel (VIII) dann nach vorheriger Abspaltung einer optional eingeführten Schutzgruppe in ein entsprechendes Isothiocyanat überführt wird,

- vii) das Isothiocyanat anschließend mit dem Konjugat der Formel (VI) zum Thioharnstoff der Formel (IX) gekuppelt wird und

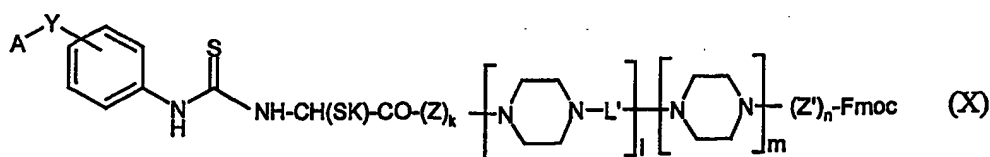


- vii) in einem optionalen letzten Schritt gegebenenfalls noch vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden,

wobei die aufeinanderfolgenden Schritte v) und vi) zu einem beliebigen Zeitpunkt vor Schritt vii) durchgeführt werden können.

In allen Reaktionsschritten können reversibel abspaltbare Schutzgruppen, wie sei in der Peptidchemie üblich sind, eingesetzt werden. Eine Schutzgruppe SG kann erhalten bleiben, oder gleichzeitig mit der Boc-Schutzgruppe abgelöst oder in einem separaten Schritt abgelöst werden. Geeignete Schutzgruppen sind beispielsweise die mit Trifluoressigsäure spaltbare Boc-Schutzgruppe oder die mit Piperidin oder Morpholin spaltbare Fmoc-Schutzgruppe. Weitere geeignete Schutzgruppen und die entsprechenden Methoden zur Einführung und Abspaltung wurden z. B. beschrieben in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder im Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Vierte Auflage; Band 15.1 und 15.2, herausgegeben von E. Wünsch.

Optional können die Affinitätsmarker auch in umgekehrter Reihenfolge aufgebaut werden, wobei zunächst aus Derivaten der Formel (IV) die Boc-Schutzgruppe abgelöst wird. Die deblockierten Verbindungen werden dann mit entsprechend aus (VIII) generierten Isothiocyanaten umgesetzt zu Verbindungen der Formel



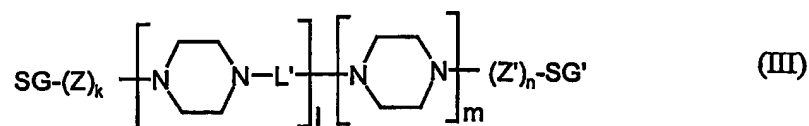
Nach Ablösung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin wird im letzten Schritt die Kupplung mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe



vorgenommen und so ebenfalls Verbindungen der Formel (IX) erhalten.

Weiterhin Gegenstand der Erfindung ist demgemäß ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß Anspruch 1, bei dem

- 5 i) ein geschütztes Intermediat der Formel (III),

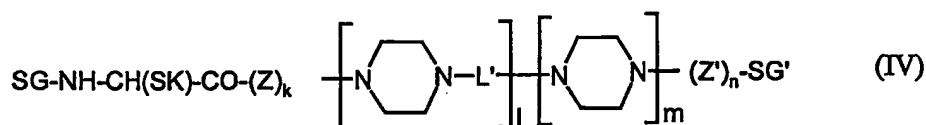


in der SG und SG' für zwei orthogonale Schutzgruppen stehen,

10

hergestellt wird,

- ii) aus dem Intermediat der Formel (III) zunächst die Schutzgruppe SG abgelöst wird und anschließend ein weiteres Aminosäurederivat, das eine zu der
 15 abgelösten gleiche oder verschiedene Schutzgruppe SG an der α -Amino-
 funktion trägt, angeknüpft wird, wobei ein Derivat der Formel (IV),



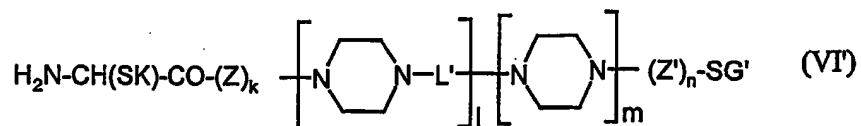
20

in der SK für die Seitenkette einer Aminosäure steht,

erhalten werden,

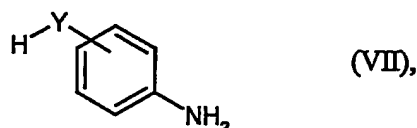
- iii) die terminale Schutzgruppe SG abgelöst wird, wobei ein Konjugat der Formel
 25 (VI)

- 21 -



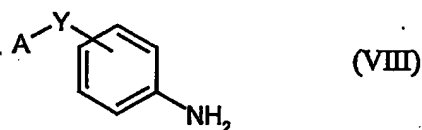
erhalten wird,

- 5 iv) ein Affinitätsligand A-OH oder A-NH₂ oder eine Hydroxy-, Carboxy- oder Amino-funktionalisierte feste Phase A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form davon mit einer Verbindung der Formel (VII),



10 in der Y für die optional verzweigte Abstandhaltergruppe steht,

die optional eine Schutzgruppe tragen kann, zum Derivat der Formel (VIII)

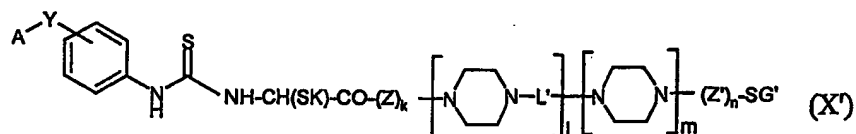


15 umgesetzt wird,

- 20 v) das Derivat der Formel (VIII) dann nach vorheriger Abspaltung einer optional eingeführten Schutzgruppe in ein entsprechendes Isothiocyanat überführt wird,
- vi) das Isothiocyanat anschließend mit dem Konjugat der Formel (VI') zum Thiohamstoff der Formel (X') gekuppelt wird und

25

- 22 -



- vii) nach Ablösung der Schutzgruppe SG' aus dem Thioharnstoff der Formel (X') mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe der Formel (V),

U-PRG (V)

in der U für eine Gruppe steht, die die Verknüpfung von PRG mit Z' oder gegebenenfalls mit einer anderen Endgruppe von L ermöglicht,

umgesetzt wird und

- viii) in einem optionalen letzten Schritt gegebenenfalls noch vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden,

wobei die aufeinanderfolgenden Schritte iv) und v) zu einem beliebigen Zeitpunkt vor Schritt vi) durchgeführt werden können.

Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen durchgeführt werden, beispielsweise bei 0,5 bis 2 bar und vorzugsweise unter Normaldruck, bzw. -30 bis +100 °C und vorzugsweise -10 bis + 80 °C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktion in DMF, Dichlormethan, THF, Dioxan/Wasser oder THF/Dichlormethan bei Raumtemperatur oder unter Eiskühlung und Normaldruck bevorzugt.

5 Somit können die beschriebenen Typen von Affinitätsmarkern auf verschiedenen Wegen sowohl linear als auch durch Kupplung bereits vorgefertigter Blöcke hergestellt werden. Das modulare Aufbauprinzip ermöglicht eine Vielzahl von denkbaren Kombinationen und damit bei geeigneter Auswahl von isotopenmarkierten Modulen eine beliebige Festlegung von Art, Zahl und Platzierung der Isotopenmarkierungen. In Molekülen gleicher Bauart lassen sich nur unter Einbezug von ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen beliebig viele, vorzugsweise bis zu 30 Isotopenmarkierungen, realisieren. Damit wird der Weg zur Simultananalyse von mehreren, bevorzugt bis zu 4 komplexen Proteomproben eröffnet.

Beispiele

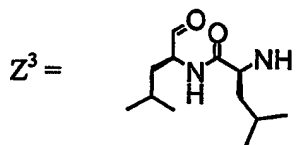
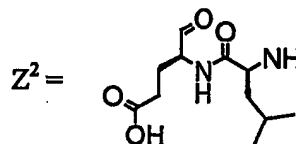
Es wurden 42 Affinitätsmarker der Formel (II), in der A der Acyl-Rest von Biotin ist, und ein Affinitätsmarker der Formel (II), in der A ein mit Aminogruppen funktionalisierter polymerer Träger ist, (Beispiel 42) hergestellt und sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst. Z und Z' stehen dabei, soweit vorhanden, mit Ausnahme von Z in Beispiel 26 und Z' in Beispiel 43 für den jeweiligen Glycin-Rest, so dass jeweils nur der Wert von k bzw. n angegeben sowie für (Z)_k in Beispiel 26 die Gruppe Z¹ und für (Z')_n in Beispiel 43 die Gruppe Z² angegeben und definiert ist.

Bsp.	S		(Z) _k	[(C ₄ H ₈ N ₂)L'] _l		[C ₄ H ₈ N ₂] _m	(Z') _n	PRG
	Y	SK von	k	l	L'	m	n	
1	NHCH ₂	Gly	1	0	—	1	1	q = 0
2	NHCH ₂	Gly	1	0	—	1	1	q = 1
3	NHCH ₂	His	1	0	—	1	1	q = 0
4	NHCH ₂	Asp	1	0	—	1	1	q = 1
5	NHCH ₂	Val	1	0	—	1	1	q = 1
6	NHCH ₂	Pro	1	0	—	1	1	q = 1
7	NHCH ₂	D-Val	1	0	—	1	1	q = 1
8	NHCH ₂	Gly	0	0	—	1	1	q = 1
9	NHCH ₂	Asn	1	0	—	1	1	q = 1
10	NH(CH ₂) ₂ - NHCO	Gly	1	0	—	1	1	q = 1
11	NH	Gly	1	0	—	1	1	q = 1
12	NHCH ₂	D-Val	0	0	—	1	1	q = 1
13	NH	Gly	1	0	—	1	1	q = 4
14	NH	Gly	1	0	—	1	1	q = 2
15	NH	Gly	1	0	—	1	1	AA
16	NH	Gly	1	0	—	1	1	r = 1
17	NH	Gly	1	1	L ¹	1	1	q = 1

Bsp.	S		(Z) _k	[(C ₄ H ₈ N ₂)L'] _l		[C ₄ H ₈ N ₂] _m	(Z') _n	PRG
	Y	SK von	k	l	L'	m	n	
18	NH	Gly	1	2	L ¹	1	1	q = 2
19	NH	Gly	1	1	CO-CO	1	1	q = 1
20	NH	Gly	1	1	L ²	1	1	q = 1
21	NH	His	1	0	—	1	1	q = 2
22	NH	Glu	1	0	—	1	1	q = 2
23	NH	His	1	0	—	1	1	q = 2
24	NHCH ₂	Gly	0	0	—	1	1	q = 2
25	NHCH ₂	His	0	0	—	1	1	q = 2
26	NHCH ₂	Gly	Z ¹	0	—	1	1	q = 2
27	NH	Gly	0	1	L ¹	1	1	q = 2
28	NHCH ₂	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
29	NHCH ₂	Gly	0	1	L ³	1	1	q = 2
30	NHCH ₂	Gly	0	1	L ⁴	1	1	q = 2
31	NH	Gly	0	1	L ⁴	1	1	q = 2
32	NH	His	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
33	NHCH ₂	His	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
34	NHCH ₂	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 4
35	NH	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 4
36	NHCH ₂	His	0	1	CO-CO	1	2	q = 4
37	NH	His	0	1	CO-CO	1	2	q = 4
38	NH	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
39	NH	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
40	NH	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
41	NH	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
42	COCH ₂	Gly	0	1	CO-CO	1	2	q = 2
43	NHCH ₂	Gly	0	0	—	1	Z ²	q = 3
44	NHCH ₂	Gly	0	0	—	1	Z ³	q = 2
45	NHCH ₂	Gly	0	0	—	1	Z ³	q = 4

- 26 -

Bsp.	S		(Z) _k	[(C ₄ H ₈ N ₂)L'] _l		[C ₄ H ₈ N ₂] _m	(Z') _n	PRG
	Y	SK von		l	L'			
46	NH	Gly	0	0	-	1	Z ³	q = 2
47	NH	Gly	0	0	-	1	Z ³	q = 4
48	COCH ₂	Gly	1	0	-	1	1	q = 2

L¹ = CO-CH₂-NH-CO;AA = COCHCH₂;Z¹ = NH-(CH₂)₂-CO;L² = CO-CH₂-NH-CO-NH-CH₂-CO;L³ = (CH₂)₃-NH-CO-CO-NH-(CH₂)₃;L⁴ = (CH₂)₂-CO;

Verwendete Abkürzungen:

10	Ausb.	– Ausbeute
	Boc	– tert-Butoxycarbonyl
	DIEA	– Diisopropylethylamin (Hünig's base)
	DMAP	– Dimethylaminopyridin
	DMF	– Dimethylformamid
15	DMSO	– Dimethylsulfoxid
	EI	– Elektronenstoß-Ionisation
	ESI	– Elektrospray-Ionisation
	Fmoc	– Fluorenyl-9-methoxycarbonyl
	HPLC	– High-performance liquid chromatography
20	MALDI	– Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation
	MS	– Massenspektroskopie
	MTBE	– Methyl tert-butyl ether
	quant.	– quantitative (d. h. vollständige) Umsetzung
	RP	– Reverse phase
25	RT	– Raumtemperatur
	TCEP	– Tris(carboxyethyl)phosphin

- 27 -

- TFA – Trifluoressigsäure
THF – Tetrahydrofuran
TLC – Thin layer chromatography
(v/v) – Konzentrationsangabe in Volumen pro Volumen
5 (w/v) – Konzentrationsangabe in Masse pro Volumen

Die Angabe der Zusammensetzung von Lösungsmittel- und Elutionsmittelgemischen erfolgt, soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, durch jeweils von "/" getrennte Angabe der Komponenten und nachgestellt der relativen Volumenteile. So bedeutet
10 z. B. "Acetonitril/Wasser 10/1" ein Gemisch von Acetonitril und Wasser im Volumenverhältnis von 10 zu 1.

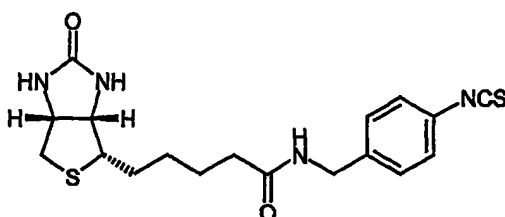
Bevorzugt verwendete Elutionsmittel (Bezugnahme durch Angabe von ¹⁾ etc.):

- 15 ¹⁾ Acetonitril/Wasser 10/1
²⁾ Acetonitril/Wasser 20/1
³⁾ Dichlormethan/Methanol 97,5/2,5
⁴⁾ Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/1/0,1
⁵⁾ Acetonitril/Wasser/Eisessig 5/1/0,2
20 ⁶⁾ Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/3/1,5
⁷⁾ Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/2/0,2
⁸⁾ Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/5/3
⁹⁾ Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/4/0,5

25 Zur nachfolgend beschriebenen Herstellung der beispielhaften Affinitätsmarker wurden zunächst die Biotin-Derivate der Edukt-Serie 1 und die Piperazin-Derivaten der Edukt-Serie 2 hergestellt. Anschließend wurden die Piperazin-Derivate in die Zwischenprodukte der Intermediat-Serien 1 bis 3 überführt. Diese Intermediate wurden schließlich mit den Biotin-Derivaten zu den entsprechenden Affinitäts-
30 markern umgesetzt.

Edukt-Serie 1: Biotin-Derivate

E.1.1

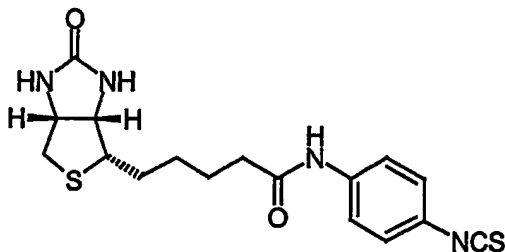


1 g (4,09 mmol) Biotin, 500 mg (4,09 mmol) 4-Aminobenzylamin sowie 830 mg (6,14 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol, 942 mg (4,91 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid und 1587 mg Ethyl-diisopropylamin wurden in 40 ml DMF zusammengegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, eingeeengt und der Rückstand aufgereinigt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Elutionsgemisch: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/3/0,3). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft. Der Rückstand wurde mit Diethylether verrührt und abgesaugt. Es wurden 1097 mg (77 %) des Zwischenproduktes erhalten [TLC: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/4/0,5; $R_f = 0,58$] [ESI-MS: $m/e = 349 (M+H)^+$].

600 mg (1,72 mmol) dieses Zwischenproduktes wurden in 40 ml Dioxan/Wasser 1/1 gelöst und mit 298 mg (2,58 mmol) Thiophosgen und 890 mg Ethyl-diisopropylamin versetzt. Es wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt und eingeeengt. Das Zielprodukt E.1.1 wurde aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 616 mg (92 %) [TLC: $R_f = 0,56^{5)}$] [ESI-MS: $m/e = 391 (M+H)^+$].

E.1.2



5 Mono-Fmoc-geschütztes p-Phenylen-diamin wurde nach Standard-Methoden, wie sie z. B. in Houben-Weyl; Methoden der Organischen Chemie; Vierte Auflage; Band XV Teil 1 und 2; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974, oder in Hans-Dieter Jakubke and Hans Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie, Weinheim 1982 beschrieben sind, hergestellt.

10 200 mg (0,82 mmol) Biotin wurden in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 974 mg (8,2 mmol) Thionylchlorid versetzt. Nach 1 h Rühren wurde eingengt und zweimal mit Dichlormethan nachdestilliert.

15 Das entstandene Säurechlorid (0,81 mmol) wurde in 30 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 387 mg (4,9 mmol) Pyridin sowie mit 242 mg (0,55 mmol) von Mono-Fmoc-geschütztem p-Phenylen-diamin versetzt. Es wurde 2 Tage bei RT gerührt und das ausgefallene Produkt abfiltriert. Erhalten wurden 300 mg (99 %) des Intermediats, das ohne weitere Aufreinigung in den nächsten Reaktionsschritt
20 eingesetzt wurde [TLC: $R_f = 0,5^{1)}$].

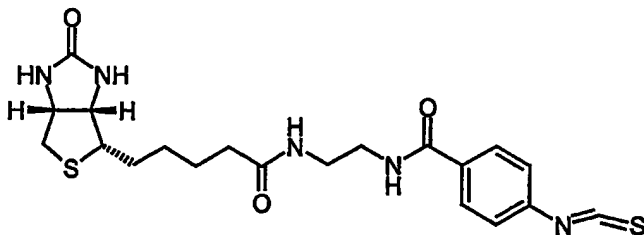
Das Rohprodukt wurde in 5 ml DMF aufgenommen und mit 500 μ l Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsgemisch ⁷⁾).

25 Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand *in vacuo* getrocknet. Erhalten wurden 69 mg (39 %) des entschützten Intermediats.

- 30 -

65 mg (0,19 mmol) dieses Zwischenproduktes wurden in 10 ml Dioxan/Wasser 1/1 gelöst und mit 33 mg (0,29 mmol) Thiophosgen und 100 mg Ethyl-diisopropylamin versetzt. Es wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt und eingengt. Das
5 Zielprodukt E.1.2 wurde aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether ausgefällt.
Ausbeute: 65 mg (89 %) [TLC: $R_f = 0,43$ ¹⁾] [ESI-MS: $m/e = 377$ ($M+H$)⁺].

E.1.3



500 mg (3,65 mmol) 4-Amino-benzoesäure wurden in 20 ml DMF aufgenommen und mit 872 mg (2,73 mmol) vom Hydrochlorid des Mono-Fmoc-geschützten Ethylendiamins sowie mit 739 mg (5,47 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und mit
15 839 mg (4,38 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid versetzt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt, eingengt und der Rückstand in 200 ml Dichlormethan aufgenommen. Es wurde dreimal mit 200 ml Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt
20 (Elutionsmittel: Acetonitril). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 639 mg (59 %) des Zwischenproduktes [TLC: $R_f = 0,68$ ²⁾]

400 mg (1 mmol) des Intermediats wurden in 10 ml DMF aufgenommen und mit
25 500 μ l Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsgemisch: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/4/0,5). Die

- 31 -

entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand *in vacuo* getrocknet. Erhalten wurden 147 mg (82 %) des entschützten Intermediats [TLC: $R_f = 0,18$ ⁵].

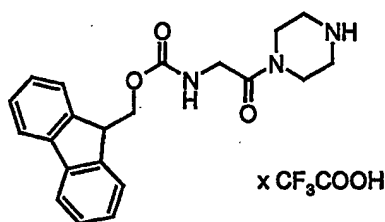
- 5 191 mg (0,78 mmol) Biotin wurden in 10 ml DMF aufgenommen und mit 158 mg (1,17 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 180 mg (0,94 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid versetzt. Es wurde 10 min bei RT gerührt und dann 303 mg Ethyl-diisopropylamin sowie 140 mg (0,78 mmol) des entschützten Intermediats zugesetzt. Dann wurde nochmals 6 h bei RT gerührt,
- 10 eingengt und das Rohprodukt aus Dichlormethan mit Diethylether ausgefällt. Der Rückstand wurde abgetrennt und durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsgemisch: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/3/0,3). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Es wurden 222 mg (70 %) des
- 15 Zwischenproduktes erhalten [TLC: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/4/0,5; $R_f = 0,47$].

- 200 mg (0,54 mmol) dieses Zwischenproduktes wurden in 15 ml Dioxan/Wasser 1/1 gelöst und mit 94 mg (0,81 mmol) Thiophosgen und 210 mg Ethyl-diisopropylamin versetzt. Es wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt und eingengt. Das
- 20 Zielprodukt wurde aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 230 mg (95 %) [TLC: $R_f = 0,44$ ⁵]

[ESI-MS: $m/e = 448$ (M+H)⁺].

25

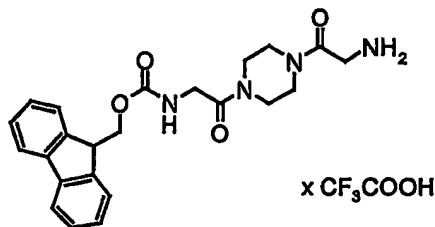
Edukt-Serie 2: Piperazin-Derivate**E.2.1**

3,85 g (13 mmol) Fmoc-Glycin, sowie 2,19 g (16,2 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 2,48 g (13 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid wurden in 80 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 2,01 g (10,8 mmol) Boc-Piperazin gelöst in 40 ml DMF zugetropft und weiterhin 2,8 g Ethyl-diisopropylamin hinzugefügt. Es wurde über 2h bei RT gerührt und eingengt. Man nahm den Rückstand in Dichlormethan auf und schüttelte zweimal mit Wasser. Die organische Phase wurde abgetrennt, eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel: Acetonitril). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 3,91 g (78 %) des Zwischenproduktes [TLC: $R_f = 0,58$ ²⁾].

3,9 g (8,4 mmol) dieses Intermediats wurden in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 25 ml TFA versetzt. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt, abfiltriert und getrocknet. Erhalten wurden 4,8 g (93 %) des Zielproduktes E.2.1 [TLC: $R_f = 0,31$ ⁵⁾].

- 33 -

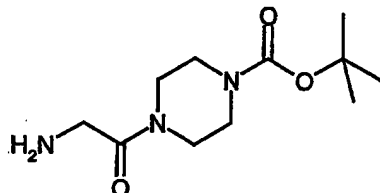
E.2.2



5 0,53 g (3 mmol) Boc-Glycin sowie 0,51 g (3,75 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol
und 0,58 g (3 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
wurden in 40 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT geführt. Anschließend
wurden 1 g Ethyl-diisopropylamin und dann langsam 1,2 g (2,5 mmol) des Produktes
E.2.1 hinzugefügt. Es wurde über Nacht bei RT geführt und eingengt. Der
10 Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit Natrium-
hydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt,
eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt
(Elutionsmittel: Acetonitril/Wasser 30/1). Die entsprechenden Fraktionen wurden
vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet.
15 Erhalten wurden 760 mg (58 %) des Zwischenproduktes [TLC: $R_f = 0,6$ ²⁾].

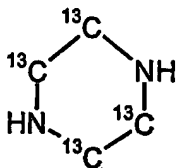
760 mg (1,45 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml Dichlormethan
aufgenommen und mit 5 ml TFA versetzt. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur
wurde eingengt und der Rückstand aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt,
20 abfiltriert und getrocknet. Erhalten wurden 780 mg des Zielproduktes E.2.2
(quantitative Umsetzung) [TLC: $R_f = 0,4$ ⁵⁾].

E.2.3



5 3,85 g (13 mmol) Fmoc-Glycin, sowie 2,19 g (16,2 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzo-
triazol und 2,48 g (13 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
Hydrochlorid wurden in 80 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt.
Anschließend wurden 2,01 g (10,8 mmol) Boc-Piperazin gelöst in 40 ml DMF
zugetropft und weiterhin 2,8 g Ethyl-diisopropylamin hinzugefügt. Es wurde über 2 h
10 bei RT gerührt und eingengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen
und zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt,
eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt
(Elutionsmittel: Acetonitril). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das
Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden
15 3,91 g (78 %) des Zwischenproduktes [TLC: $R_f = 0,58$ ²⁾].

730 mg (1,57 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 ml DMF gelöst und mit 500 μ l
Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde eingengt und durch Flash-
Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel ⁷⁾). Die entsprechenden
20 Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft. Der
Rückstand wurde mit Diethylether/Petrolether 1/1 verrührt, anschließend abfiltriert
und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 222 mg (58 %) des Zielproduktes
E.2.3 [TLC: $R_f = 0,18$ ⁷⁾].

E.2.4: Piperazin- $^{13}\text{C}_4$ 

5 Die Aminogruppe von Glycin- $^{13}\text{C}_2$ wurde nach Standardbedingungen mit der t-Butoxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppe geschützt.

Anschließend wurden 1,175 g (3,83 mmol) Boc-Glycin- $^{13}\text{C}_2$ in Dioxan/Wasser 1/1 gelöst und mit 2,5 g (7,67 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt. Es wurde lyophilisiert,
10 das Produkt in DMF aufgenommen und dann mit 2,72 g (19,17 mmol) Iodmethan versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde eingeeengt und der Rückstand zwischen Dichlormethan und Wasser verteilt. Die organische Phase wurde nochmals mit Wasser gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Erhalten wurden 530 mg (72 %) des Methylesters.

15 525 mg (2,75 mmol) des Boc-geschützten Methylesters wurden dann an der Aminogruppe mit Trifluoressigsäure entschützt (Ausbeute: 506 mg; 90 %).

20 Das erhaltene Produkt (500 mg) wurde nach Standardbedingungen mit Boc-Glycin- $^{13}\text{C}_2$ zum beidseitig geschützten, vier ^{13}C -Atome enthaltenden Dipeptid-Konjugat umgesetzt (Ausbeute: 452 mg; 74 %).

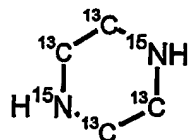
Von diesem Zwischenprodukt wurde erneut mit TFA die Boc-Gruppe abgelöst (quantitative Umsetzung).

25 475 mg (1,8 mmol) dieses N-terminal deblockierten, ^{13}C -markierten Dipeptidmethylester-Trifluoracetats wurden in 15 ml Methanol gelöst und mit 697 mg (5,4 mmol) Ethyl-diisopropylamin versetzt. Es wurde 3 Tage bei RT gerührt, wobei sich das

Diketopiperazin bildete und ausfiel. Es wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute: 138 mg; 65 %).

130 mg (1,1 mmol) des ^{13}C -markierten Diketopiperazins wurden unter Argon in 40 ml THF aufgenommen und mit 284 mg (3,3 mmol) THF-Boran-Komplex versetzt. Es wurde 12 h unter Rückfluß gerührt und erneut 284 mg (3,3 mmol) THF-Boran-Komplex zugesetzt. Nach weiteren 16 h Rückfluß wurde abkühlen gelassen und mit 6 ml 10 %iger Salzsäure gequenchet. Es wurde noch 30 min gekocht, dann abkühlen gelassen, eingeengt und der Rückstand mit Dichlormethan/Methanol nachdestilliert. Der Rückstand wurde dann mit Dichlormethan/Methanol 4:1 gewaschen und abfiltriert. Erhalten wurden 145 mg (81 %) des vierfach ^{13}C -markierten Piperazins E.2.4 [TLC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/3/1,5; $R_f = 0,23$] [EI-MS: $m/z = 90$ (M)⁺ Radikal-Ion].

E.2.5: Piperazin- $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{C}_4$

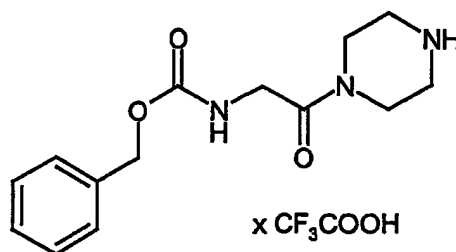


Dieser Baustein wurde analog zu E.2.4 hergestellt ausgehend von Glycin- $^{13}\text{C}_2$ - ^{15}N .

Aus diesen ^{13}C -markierten bzw. den ^{13}C - und ^{15}N -markierten Intermediaten E.2.4 und E.2.5 wurden alle Zwischen- und Endprodukte der nachfolgenden Intermediat-Serien und Beispiele in gleicher Weise wie für die nicht-markierten ^{12}C - und ^{14}N -Analoge beschrieben hergestellt.

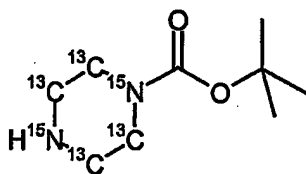
- 37 -

E.2.6



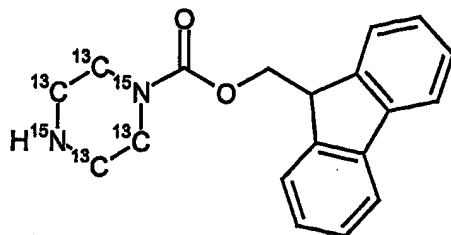
- 5 7,459 g (24,36 mmol) Benzyloxycarbonyl-glycin-N-hydroxysuccinimidester wurden in 70 ml DMF mit 3 g (34,83 mmol) Piperazin und Ethyldiisopropylamin zusammengegeben und 2h bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeeengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/2/0,2). Die entsprechenden
- 10 Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 4,04 g (60 %) der Zielverbindung [TLC: $R_f = 0,26^{57}$].

E.2.7



In die Verbindung E.2.5 wurde nach Standardbedingungen mit 0,5 Äquivalenten Boc-Anhydrid die Boc-Schutzgruppe eingeführt. Ausbeute: 65 % [TLC: $R_f = 0,22^{57}$].

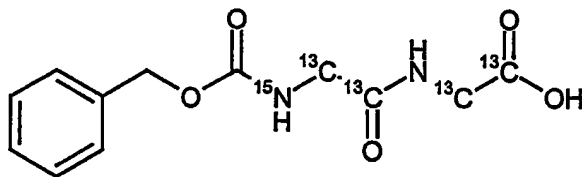
E.2.8



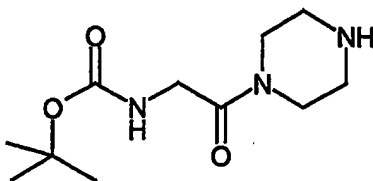
- 5 In die Verbindung E.2.7 wurde zunächst nach Standardbedingungen mit Fmoc-Cl die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt und anschließend mit Trifluoressigsäure die Boc-Schutzgruppe abgelöst. [TLC: $R_f = 0,32$ ⁵⁾].

E.2.9

- 10



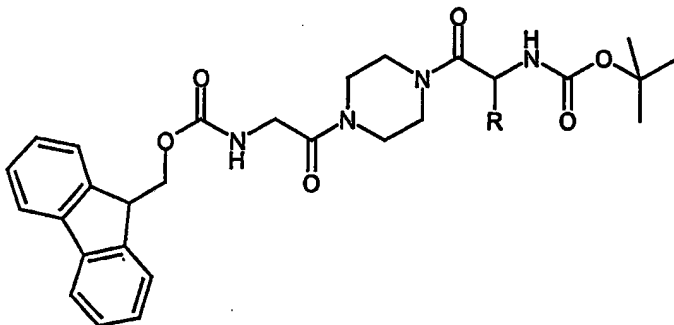
- Das zwei ¹⁵N und drei ¹³C-Labels tragende, geschützte Dipeptid wurde nach Standardbedingungen über 5 Stufen hergestellt: Zunächst wurde in [Bis-¹³C, ¹⁵N]-Glycin mit Benzyloxycarbonyl-chlorid in Dioxan/1N Natronlauge die Z-Schutzgruppe eingeführt (Ausbeute: 47 %). Dieses Aminosäurederivat wurde mit [Bis-¹³C]-Glycin-methylester (Zwischenprodukt bei der Herstellung von E.2.4) gekuppelt (Ausbeute: 77 %) und im letzten Schritt mit 2N Lithiumhydroxid in Methanol der Methylester gespalten (Ausbeute: 75 %). [TLC: $R_f = 0,25$ ⁴⁾] [ESI-MS: $m/e = 272$ (M+H)⁺].

E.2.10

- 5 Herstellung analog zu E.2.6 oder aus Fmoc-Pip.
[TLC: $R_f = 0,35$ ⁵⁾].

Intermediat-Serie 1: Vollgeschützte Aminosäure-flankierte Piperazin-Derivate

- 10 Allgemeine Formel:

**Allgemeine Vorschrift:**

15

- 3 mmol eines Boc-geschützten Aminosäure-Derivats sowie 0,51 g (3,75 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 0,58 g (3 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid wurden in 40 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 1 g Ethyl-diisopropylamin hinzugefügt und dann 2,5 mmol der Produkte E.2.1 oder E.2.2 in 40 ml DMF gelöst, zugetropft. Es wurde über Nacht bei RT gerührt und eingengt. Man nahm den Rückstand in Dichlormethan auf und schüttelte zweimal mit Natriumhydrogencarbonatlösung aus.
- 20

- 40 -

Die organische Phase wurde abgetrennt, eingengt und der Rückstand entweder durch Fällung aus Dichlormethan mit Diethylether oder durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel: Acetonitril/Wasser 30/1). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden die vollgeschützten Intermediate.

I.1.1 (R = H (Rest von Glycin))

10 Edukte: Boc-Glycin; E.2.1
 Ausbeute: 58 % $R_f = 0,45$ ¹⁾

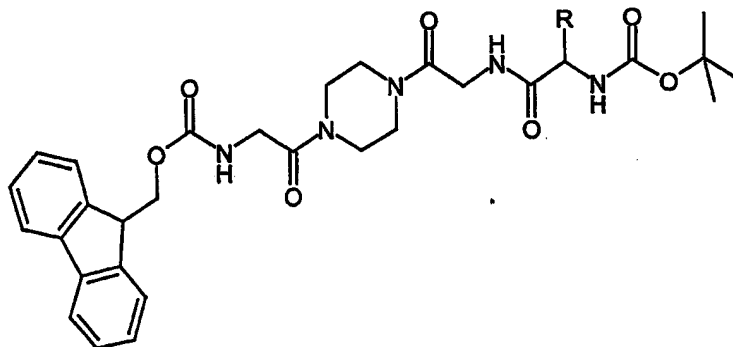
I.1.2 (R = Rest von D-Valin)

15 Edukte: Boc-D-Valin; E.2.1
 Reinigung: Flash-Chromatographie; Eluent: Dichlormethan/Methanol 98/2
 Ausbeute: 76 % $R_f = 0,3$ ³⁾

Intermediat-Serie 2: Vollgeschützte Peptid-flankierte Piperazin-Derivate

20

Allgemeine Formel:



Die Produkte der Intermediat-Serie 2 wurden nach der gleichen allgemeinen Vorschrift wie zuvor für die Intermediat-Serie 1 beschrieben hergestellt.

I.2.1 (R = H (Rest von Glycin (Gly)))

5

Edukte: Boc-Glycin; E.2.2
Ausbeute: 86 % $R_f = 0,55$ ¹⁾

I.2.2 (R = Rest von Seitenketten-Boc-geschütztem Histidin (His))

10

Edukte: Bis-Boc-Histidin-N-hydroxysuccinimidester; E.2.2
Besonderheiten: Anstelle der EDCI/HOBT Aktivierung wurde hier sofort der Hydroxy-succinimidester eingesetzt. Reinigung durch Fällung.
Ausbeute: 85 % $R_f = 0,47$ ¹⁾

15

I.2.3 (R = Rest von Seitenketten-tert-butylester-geschützter Asparaginsäure (Asp))

Edukte: Boc-Asparaginsäure- γ -tert-butylester; E.2.2
Besonderheiten: Reinigung durch Fällung.
Ausbeute: 68 % $R_f = 0,66$ ¹⁾

20

I.2.4 (R = Rest von Valin (Val))

Edukte: Boc-Valin; E.2.2
Besonderheiten: Reinigung durch Fällung.
Ausbeute: 79 % $R_f = 0,64$ ⁴⁾

25

I.2.5 (R = Rest von Asparagin (Asn))

30

Edukte: Boc-Asparagin; E.2.2

- 42 -

Besonderheiten: Reinigung durch Flashchromatographie mit Elutionsmittel ²⁾

Ausbeute: 66 % $R_f = 0,47$ ¹⁾

I.2.6 (R = Rest von Prolin (Pro))

5

Edukte: Boc-Prolin-N-hydroxysuccinimidester; E.2.2

Besonderheiten: Das aktivierte Aminosäurederivat wurde anstelle von EDCI/HOBT eingesetzt. Reinigung durch Flashchromatographie mit Acetonitril/Wasser 15/1.

10 Ausbeute: 98 % $R_f = 0,55$ ⁵⁾

I.2.7 (R = Rest von D-Valin (D-Val))

Edukte: Boc-D-Valin; E.2.2

15 Besonderheiten: Reinigung durch Flashchromatographie mit Acetonitril/Wasser 30/1

Ausbeute: 80 % $R_f = 0,64$ ¹⁾

I.2.8 (R = Rest von β -Alanin)

20 Edukte: Boc- β -Alanin; E.2.1

Besonderheiten: Zunächst wurde E.2.1 mit Boc- β -Alanin umgesetzt, dann die Boc-Gruppe abgelöst, und schließlich Boc-Glycin angeknüpft.

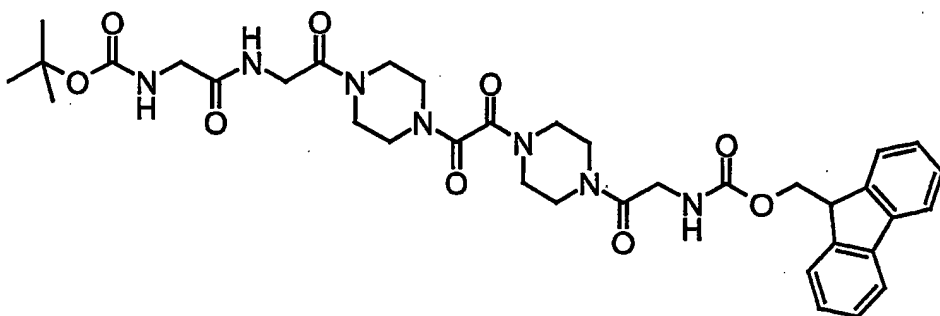
Ausbeute: 15 % über 3 Stufen $R_f = 0,45$ ⁷⁾

I.2.9 (R = Rest von tert-Butylester-geschützter Glutaminsäure)

25

Edukte: Boc-Glutaminsäure- γ -tert-butylester; E.2.2

Ausbeute: 98 % $R_f = 0,75$ ¹⁾

Intermediat-Serie 3: Oligo-Piperazin-Derivate**I.3.1**

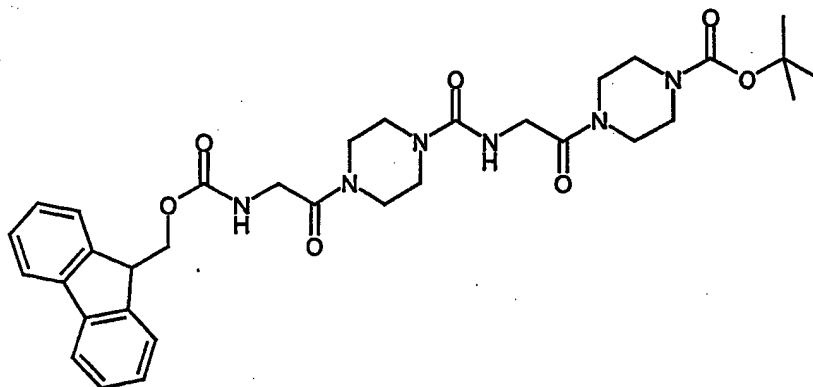
1438 mg (7,72 mmol) Boc-Piperazin wurden in 100 ml Dichlormethan gelöst und dann mit 500 mg (3,86 mmol) Oxalylchlorid und mit 625 µl Pyridin versetzt. Nach 1h Rühren bei RT wurde eingengt und der Rückstand zweimal mit Wasser verrührt. Der verbleibende Feststoff war ausreichend rein und wurde im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 1230 mg (75 %).

Nach Standardbedingungen wurden aus 1230 mg dieses Intermediats beide Boc-Schutzgruppen abgelöst (Ausbeute: 1330 mg; quantitative Umsetzung).

305 mg (1,31 mmol) Boc-Glycyl-glycin, sowie 242 mg (1,79 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 275 mg (1,43 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid wurden in 25 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 543 mg (1,2 mmol) des beidseitig entschützten Intermediats gelöst in 5 ml DMF zugetropft und weiterhin 625 µl Ethyldiisopropylamin hinzugefügt. Es wurde 1 h bei RT gerührt und dann eingengt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel ⁵⁾). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 276 mg (53 %) des Zwischenproduktes [TLC: R_f = 0,32 ⁵⁾].

182 mg (0,61 mmol) Fmoc-Glycin, sowie 124 mg (0,92 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 141 mg (0,74 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid wurden in 20 ml DMF zusammengegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 2270 mg (0,61 mmol) des oben beschriebenen Zwischenproduktes und weiterhin 320 µl Ethyl-diisopropylamin hinzugefügt. Es wurde über 2h bei RT gerührt und eingengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit Wasser geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde dann aus Dichlormethan/Methanol 1/1 mit Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 195 mg (44 %) des Zwischenproduktes I.3.1 [TLC: $R_f = 0,52^4$].

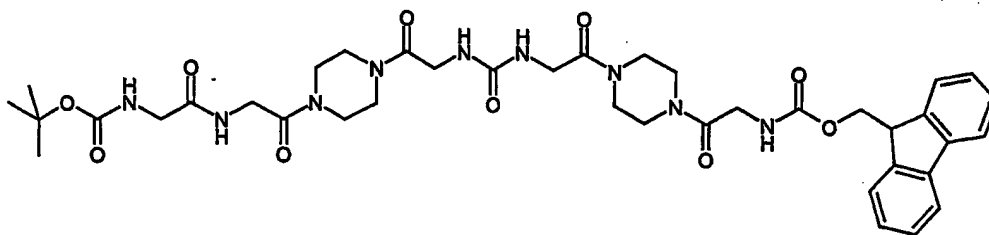
I.3.2



30 mg (0,123 mmol) des Edukts E.2.3 wurden in Dichlormethan gelöst und dann mit 25 mg (0,123 mmol) Chlorameisensäure-4-nitrophenylester versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT gab man 172 µl Diisopropylethylamin zu und nach weiteren 30 min 59 mg (0,123 mmol) des Eduktes E.2.1. Man ließ über Nacht bei RT stehen und engte danach ein. Der Rückstand wurde in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel ²⁾). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo*

abgedampft und der Rückstand in Dioxan/Wasser 1/1 aufgenommen und lyophilisiert. Erhalten wurden 55 mg (70 %) des Zwischenproduktes I.3.2 [TLC: $R_f = 0,52$ ¹⁾] [ESI-MS: $m/e = 635$ (M+H)⁺].

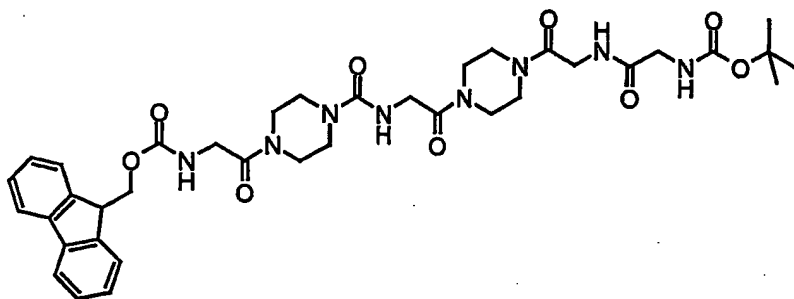
5 I.3.3



368 mg (0,63 mmol) des Intermediats I.2.1 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und
10 mit 500 μ l Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde
eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt
(Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %) 15/3/0,3). Die
entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo*
abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 204 mg (90 %) des Ziel-
15 produktes Boc-Gly-Gly-Pip-Gly [TLC: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak
(17 %) 15/4/0,5; $R_f = 0,28$].

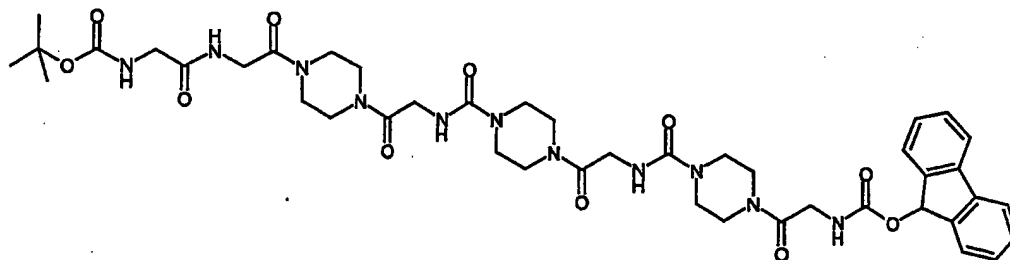
70 mg (0,196 mmol) dieses Intermediats wurden in 18 ml Dichlormethan gelöst und
dann mit 59 mg (0,294 mmol) Chlorameisensäure-4-nitrophenylester versetzt. Nach
20 10 min Rühren bei RT wurden 273 μ l Diisopropylethylamin und nach weiteren 2 h
105 mg (0,196 mmol) der Verbindung B.2.2 zugegeben. Es wurde über Nacht bei RT
geführt. Dabei fiel ein Feststoff aus, der abfiltriert wurde. Erhalten wurden 15 mg
(10 %) des Zwischenproduktes I.3.3 [TLC: $R_f = 0,18$ ⁴⁾] [ESI-MS: $m/e = 806$
(M+H)⁺].

I.3.4



Aus der Verbindung I.3.2 wurde zunächst nach bekannter Weise die Boc-Schutzgruppe abgelöst. Anschließend wurde Boc-Gly-Gly-OH in Gegenwart von EDCI/HOBT angeknüpft. Erhalten wurden das Zielprodukt I.3.4 in einer Ausbeute von 46 % über 2 Stufen.[TLC: $R_f = 0,62$ ⁵⁾]

I.3.5



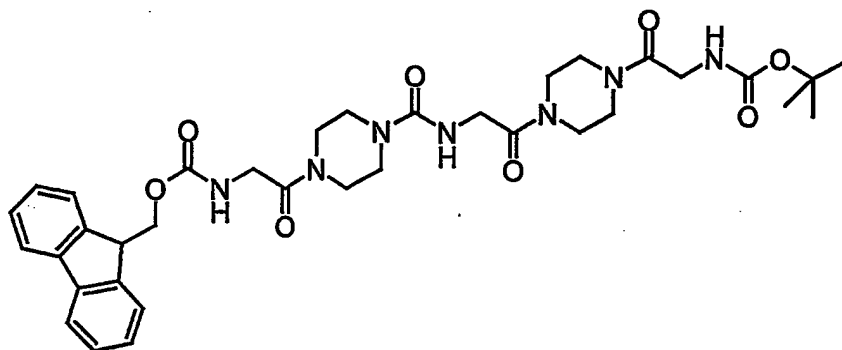
47 mg (0,193 mmol) des Edukts E.2.3 wurden in Dichlormethan gelöst und dann mit 39 mg (0,193 mmol) Chlorameisensäure-4-nitrophenylester versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurden 269 µl Diisopropylethylamin zugegeben und weitere 20 min bei RT gerührt.

Parallel dazu wurde aus der Verbindung I.3.2 in bekannter Weise die Boc-Schutzgruppe abgelöst. 125 mg (0,193 mmol) des entschützten Produktes wurden dann zu obigem Ansatz hinzugefügt. Es wurde 4 h bei RT gerührt und anschließend mit 10 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde eingengt und der Rückstand aus Dichlormethan/Methanol 1/1 mit Diethylether gefällt. Der

- 47 -

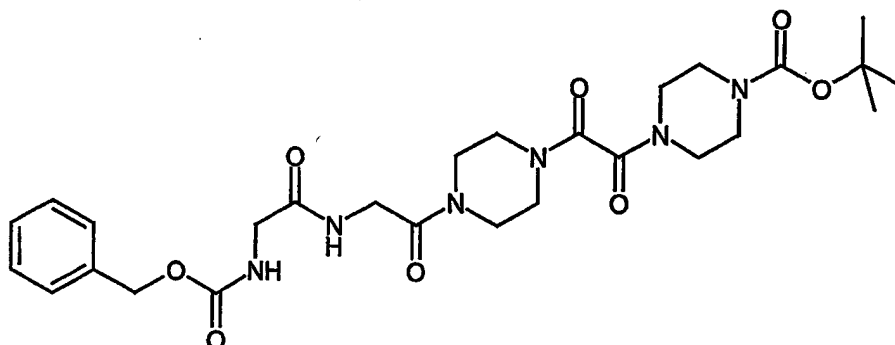
Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Erhalten wurden 124 mg (80 %) des Zwischenproduktes [TLC: $R_f = 0,2$ ⁴⁾].

5 Aus diesem Intermediat wurde erneut in bekannter Weise die Boc-Schutzgruppe abgelöst. Anschließend wurde Boc-Gly-Gly-OH in Gegenwart von EDCI/HOBT angeknüpft. Erhalten wurden das Zielprodukt in einer Ausbeute von 35 % über 2 Stufen [TLC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5/1/0,2: $R_f = 0,42$] [ESI-MS: $m/e = 918$ ($M+H$)⁺].

10 **I.3.6**

Ausgehend von I.3.2 wurden folgende Umsetzungen nach Standardbedingungen durchgeführt: Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan (Ausbeute: 87 %), Umsetzung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (Ausbeute: 99 %). [TLC: $R_f = 0,6$ ¹⁾].

I.3.7

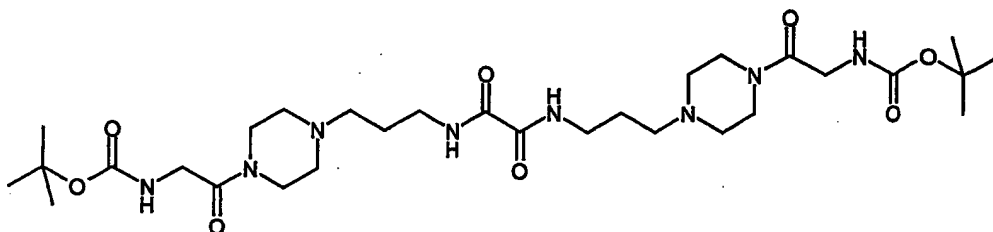


1455 mg (11,46 mmol) Oxalylchlorid wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und dann
mit 100 mg (0,24 mmol) Fmoc-Piperidin in 10 ml Dichlormethan versetzt. Nach 1h
wurde das Lösungsmittel *in vacuo* abdestilliert und der Rückstand mit
Dichlormethan nachdestilliert.

Der Rückstand wurde dann erneut in 10 ml Dichlormethan aufgenommen und zu
einer Lösung aus 44 mg (0,24 mmol) Boc-Piperidin und 187 mg Pyridin in 10 ml
Dichlormethan gegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo*
abgetrennt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Eluent:
Dichlormethan/Methanol 97,5/2,5) gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden
vereinigt und das Lösungsmittel *in vacuo* abdestilliert. Man erhielt 74 mg (57 %) des
voll geschützten Zwischenproduktes [TLC: Acetonitril/Wasser 20/1: $R_f = 0,6$].

Aus 72 mg (0,13 mmol) dieses Zwischenproduktes wurde mit Piperidin in DMF die
Fmoc-Schutzgruppe abgelöst. Nach Standardbedingungen mit EDCI/HOBT wurde
das entschützte Produkt in Gegenwart von Ethyldiisopropylamin mit
Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycin zum Zielprodukt gekuppelt. Ausbeute: 82 %
[TLC: $R_f = 0,5$ ⁴⁾].

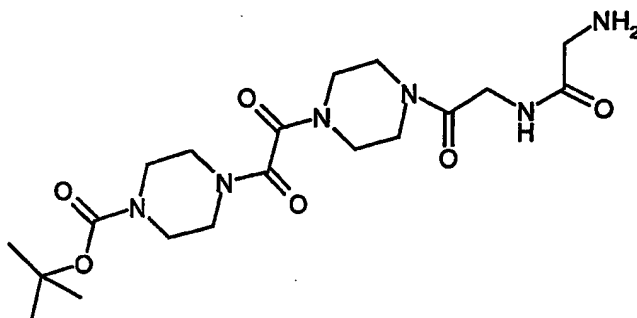
I.3.8



713 mg (2,93 mmol) N-3-Aminopropyl-N'-tert-butoxycarbonyl-piperazin und 2,3 g
5 Ethyl-diisopropylamin wurden in 100 ml Dichlormethan vorgelegt und dann
tropfenweise mit 225 mg (1,78 mmol) Oxalylchlorid versetzt. Nach 1 h Rühren bei
RT verdünnte man mit weiteren 100 ml Oxalylchlorid und schüttelte dreimal mit
5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung aus. Die organische Phase wurde über
Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Diethylether
10 digeriert und das Produkt abfiltriert. Die Mutterlauge wurde nochmals mit
Petrolether gefällt. Man erhielt 515 mg (54 %) des voll geschützten Intermediats
[TLC: $R_f = 0,3$ ⁶⁾].

Aus diesem wurde mit Trifluoressigsäure die Boc-Schutzgruppe abgelöst (quantitative
15 Umsetzung). Nach Standardbedingungen mit EDCI/HOBT wurde anschließend das
entschützte Produkt in Gegenwart von Ethyldiisopropylamin mit Boc-glycin zum
Zielprodukt gekuppelt. Ausbeute: 42 % [TLC: $R_f = 0,61$ ⁹⁾] [ESI-MS: $m/e = 655$
($M+H$)⁺].

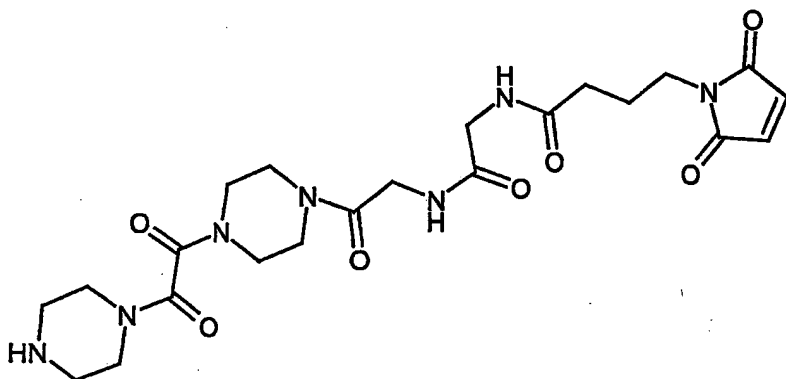
I.3.9



- 50 -

793 mg (1,38 mmol) der Verbindung aus Beispiel I.3.7 wurden in 40 ml Methanol und 15 ml THF gelöst und über Palladium/Aktivkohle (10 % Pd) hydriert. Nach 1 h wurde der Katalysator abgetrennt und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde in Dioxan/Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 512 mg (84 %) der Zielverbindung [TLC: $R_f = 0,17$ ⁵⁾].

I.3.10

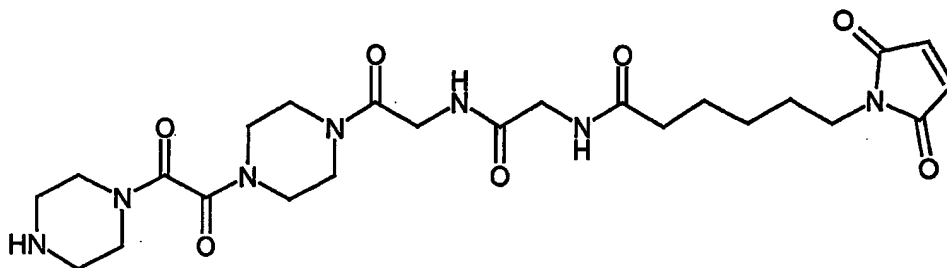


49,9 mg (0,272 mmol) ω -Maleimidobuttersäure sowie 46 mg (0,34 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol und 52 mg (0,272 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid wurden in 20 ml DMF zusammengegeben und 90 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 100 mg (0,227 mmol) der Verbindung aus Beispiel I.3.9 und weiterhin 120 μ l Ethyl-diisopropylamin hinzugefügt. Es wurde über 6 h bei RT gerührt und eingeeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde dann aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 78 mg (Ausbeute: 57 %) des Zwischenproduktes.

Aus diesem wurde mit Trifluoressigsäure die Boc-Schutzgruppe abgelöst, um die Zielverbindung zu erhalten (quantitative Umsetzung) [TLC: $R_f = 0,28$ ⁶⁾].

- 51 -

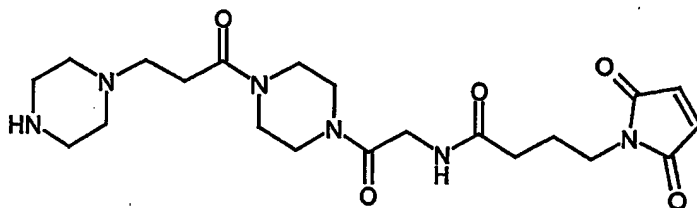
I.3.11



Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.10 ausgehend von I.3.9.

Ausbeute: 72 % [TLC: $R_f = 0,38$ ⁶⁾].

I.3.12



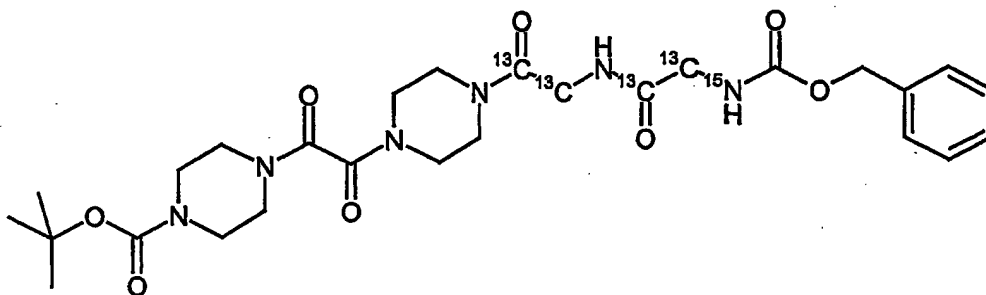
500 mg (1,94 mmol) N-2-Carboxyethyl-N'-tert.butoxycarbonyl-piperazin wurden mit 537 mg (1,94 mmol) Benzyloxycarbonyl-glycyl-piperazin (Verbindung E.2.6) nach Standardbedingungen mit EDCI/HOBT gekuppelt. Man erhielt 630 mg (Ausbeute: 63 %) des voll geschützten Intermediats [TLC: $R_f = 0,4$ ⁵⁾].

400 mg des Intermediats wurden in 40 ml Methanol und über Palladium/Aktivkohle (10 % Pd) hydriert. Nach 3 h wurde der Katalysator abgetrennt und das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand getrocknet. Man erhielt 401 mg (Ausbeute: 95 %) [TLC: $R_f = 0,2$ ⁶⁾].

Dieses Intermediat wurde wie in Beispiel I.3.10 beschrieben mit ω -Maleimidobuttersäure mit Hilfe von EDCI/HOBT gekuppelt. Anschließend wurde

- 52 -

mit Trifluoressigsäure die Boc-Gruppe abgelöst. Man erhielt die Zielverbindung in einer Ausbeute von 46 % über 2 Stufen [TLC: $R_f = 0,21$ ⁸⁾].

I.3.13

5

Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.7 mit den Bausteinen:

Fmoc-Piperidin

Oxalylchlorid

10

Boc-Piperidin

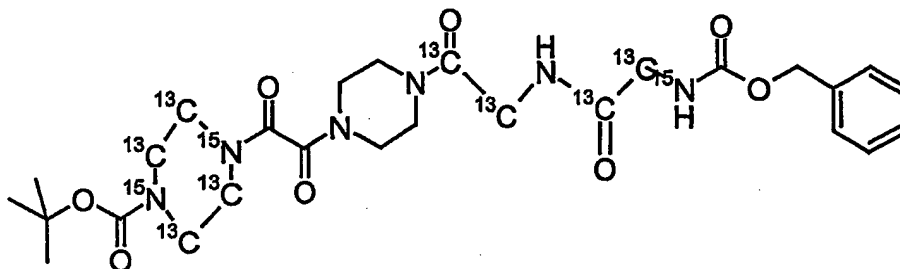
Verbindung aus Beispiel E.2.9.

Ausbeute: 52 % über 4 Stufen

[TLC: $R_f = 0,4$ ⁷⁾]

15

[ESI-MS: $m/e = 580$ ($M+H$)⁺].

I.3.14

20

Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.7 mit den Bausteinen:

Fmoc-Piperidin

Oxalylchlorid

5 Verbindung aus Beispiel E.2.7

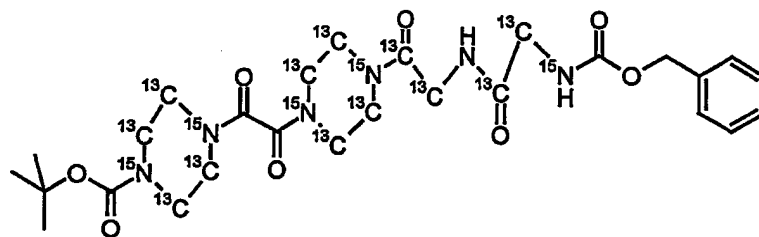
Verbindung aus Beispiel E.2.9.

Ausbeute: 38 % über 4 Stufen

[TLC: $R_f = 0,4$ ⁷⁾]

10 [ESI-MS: $m/e = 586$ (M+H)⁺].

I.3.15



15

Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.7 mit den Bausteinen:

Verbindung aus Beispiel E.2.8

Oxalylchlorid

Verbindung aus Beispiel E.2.7

20 Verbindung aus Beispiel E.2.9.

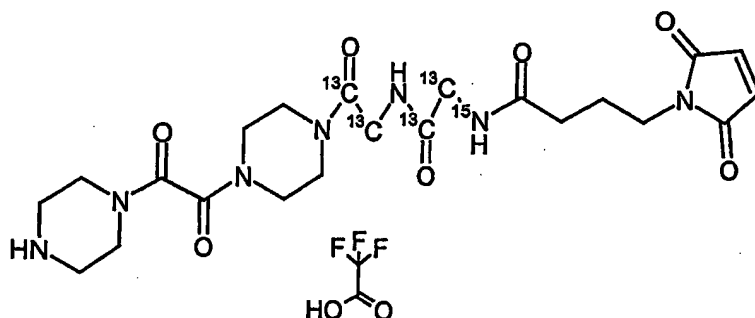
Ausbeute: 41 % über 4 Stufen

[TLC: $R_f = 0,55$ ⁴⁾]

[ESI-MS: $m/e = 592$ (M+H)⁺].

25

I.3.16

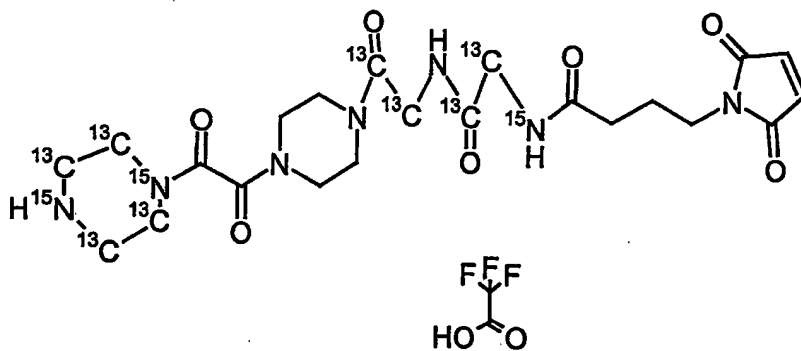


Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.9 und I.3.10 ausgehend von:
 5 Verbindung aus Beispiel I.3.13

Ausbeute: 60 % über 3 Stufen

[TLC: $R_f = 0,16$ ⁵⁾]

10 I.3.17

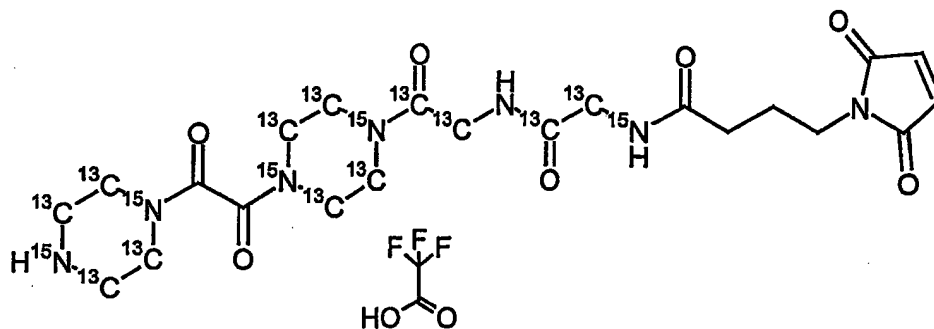


Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.9 und I.3.10 ausgehend von:
 15 Verbindung aus Beispiel I.3.14

Ausbeute: 66 % über 3 Stufen

[TLC: $R_f = 0,16$ ⁵⁾]

I.3.18

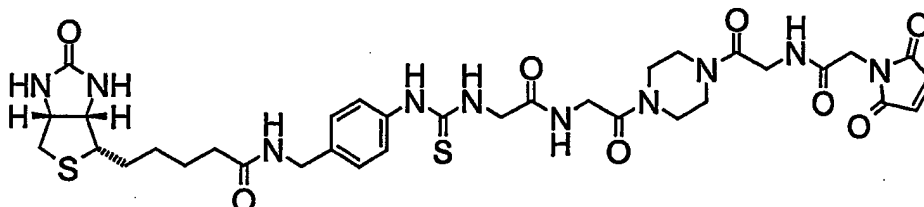


Die Herstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel I.3.9 und I.3.10 ausgehend von:

5 Verbindung aus Beispiel I.3.15

Ausbeute: 49 % über 3 Stufen

[TLC: R_f = 0,16 ⁵⁾]

Beispiele für säurespaltbare Affinitätsmarker**Beispiel 1: Herstellungsverfahren (Variante A)**

5

368 mg (0,63 mmol) des Intermediats I.2.1 wurden in 5 ml DMF aufgenommen und mit 500 μ l Piperidin versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol/wässr. Ammoniak (17 %ig) 15/3/0,3). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 204 mg (90 %) des Zielproduktes [TLC: Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17 %ig 15/4/0,5 R_f = 0,28].

10

26 mg (73 μ mol) von diesem Zwischenprodukt wurden in 10 ml DMF aufgenommen und mit 18,4 mg (73 μ mol) Maleimidoessigsäure-N-hydroxysuccinimidester sowie mit 19 mg Ethyldiisopropylamin versetzt und 1 h bei RT gerührt. Alternativ kann ebenso Maleimidoessigsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT mit der Aminkomponente gekuppelt werden. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel ²⁾). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel *in vacuo* abgedampft und der Rückstand getrocknet. Erhalten wurden 34 mg (95 %) des gewünschten Produktes [TLC: R_f = 0,17 ²⁾].

20

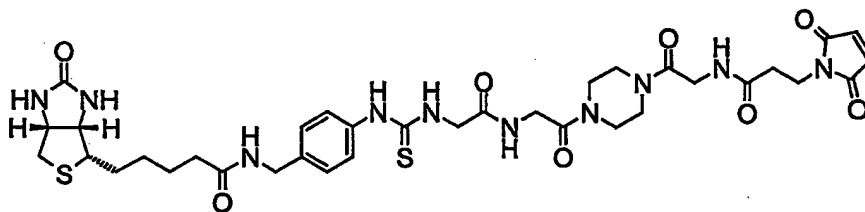
33 mg (67 μ mol) dieses Intermediats wurden in 5 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml TFA versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt. Nach

25

Filtration und Trocknung erhielt man 33 mg (97 %) des gewünschten Produkts als Trifluoressigsäuresalz [TLC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/3/1,5 R_f = 0,22] [ESI-MS: m/e = 395 ($M+H$)⁺].

- 5 32 mg (63 μ mol) des entschützten Intermediats und 26 mg (70 μ mol) des Isothiocyanats E.1.1 aus der Edukt-Serie 1 wurden in 5 ml DMF gelöst, mit 37 μ l Ethyldiisopropylamin versetzt und dann 4 h bei RT geführt. Man engte ein, verrührte den Rückstand mit Wasser und saugte ab. Der Rückstand wurde abgetrennt und dann dreimal mit Dichlormethan/Methanol 1:1 und noch zweimal mit Methanol im
10 Ultraschallbad behandelt. Nach Trocknung wurden 19 mg (35 %) der Zielverbindung erhalten [TLC: R_f = 0,5 ⁵⁾] [ESI-MS: m/e = 785 ($M+H$)⁺].

Beispiel 2: Herstellungsverfahren (Variante B)



- 182 mg (0,31 mmol) der Verbindung I.1.1 wurden in 15 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml TFA versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand aus Dichlormethan mit Diethylether gefällt.
20 Nach Filtration und Trocknung erhielt man 175 mg (94 %) des gewünschten Produkts als Trifluoressigsäuresalz [TLC: R_f = 0,2 ⁵⁾].

- 170 mg (286 μ mol) des entschützten Intermediats wurden in 10 ml DMF vorgelegt und mit 112 mg (286 μ mol) des Isothiocyanats E.1.1 aus der Edukt-Serie 1 sowie mit
25 150 μ l Ethyldiisopropylamin versetzt und dann über Nacht bei RT geführt. Es wurde eingengt, der Rückstand mit 10 ml Wasser verrührt und abgesaugt. Der Rückstand wurde abgetrennt und dann mit Dichlormethan verrührt. Nach Filtration und

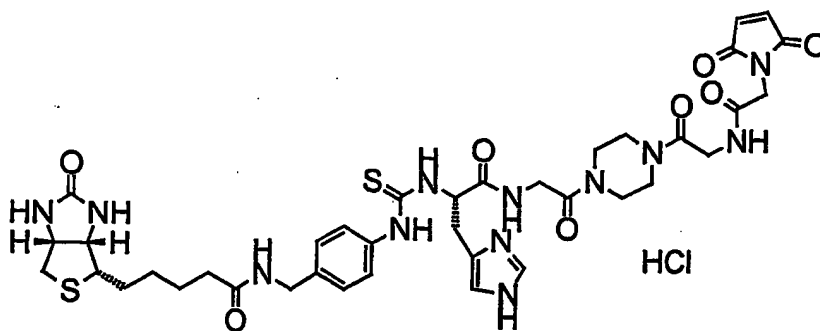
Trocknung wurden 244 mg (98 %) der gewünschten Verbindung erhalten [TLC: $R_f = 0.23$ ⁴⁾].

240 mg (0,276 mmol) dieses Intermediats wurden in 10 ml DMF aufgenommen und mit 500 μ l Piperidin versetzt. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde eingengt und der Rückstand mit Dichlormethan digeriert. Anschließend wurde abfiltriert und der Filtrerrückstand in einer Mischung aus 5 ml DMF und 10 ml Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Diethylether fiel das Produkt vollständig aus und wurde abfiltriert und getrocknet. Erhalten wurden 135 mg (76 %) des Zielproduktes [TLC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10/3/1,5 R_f = 0,2].

30 mg (46 μmol) von diesem Zwischenprodukt und 18 mg Ethyldiisopropylamin wurden zu einer Lösung aus 8 mg (46 μmol) Maleimidopropionsäure, 9,4 mg (70 μmol) HOBT, 11 mg (56 μmol) EDCI in 10 ml DMF, die zuvor 30 min vorreagiert hat, zugegeben und dann über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand mit 5 ml Wasser verrührt. Der feste Rückstand wurde dann mit 5 ml Dichlormethan/Methanol 1:1 verrührt und anschließend mit 5 ml Diethylether versetzt. Das ausgefällte Produkt wurde im Hochvakuum getrocknet. Erhalten wurden 28 mg (76 %) [TLC: $R_f = 0,4$ ⁵⁾] [ESI-MS: $m/e = 799$ ($M+H$)⁺].

Folgende Beispiele wurden in analoger Weise zu Beispiel 1 (Variante A) oder Beispiel 2 (Variante B) hergestellt. Die Variante ist nachfolgend jeweils angegeben.

Beispiel 3



HCl

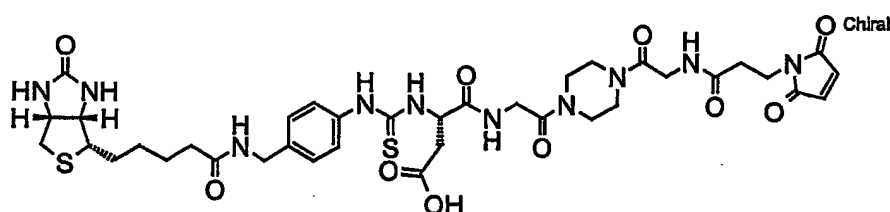
Edukte: I.2.2, E.1.1; Variante A

Ausbeute: 33 % über 4 Stufen, anschließend Überführung in das Hydrochlorid mit 1,5 Äquivalenten einer 0,1 M wässrigen Salzsäurelösung

$$R_f = 0,3 \text{ } ^6)$$

5 [ESI-MS: $m/e = 865 (M+H)^+$]

Beispiel 4



10

Edukte: I.2.3, E.1.1; Variante A

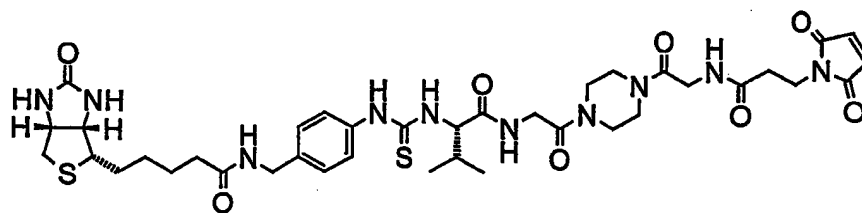
Besonderheiten: Anstelle von Maleimidoessigsäure-N-hydroxysuccinimidester wurde Maleimidopropionsäure mit EDCI/HOBT angeknüpft.

Ausbeute: 33 % über 4 Stufen

15 $R_f = 0,33$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = 857 (M+H)^+$]

Beispiel 5

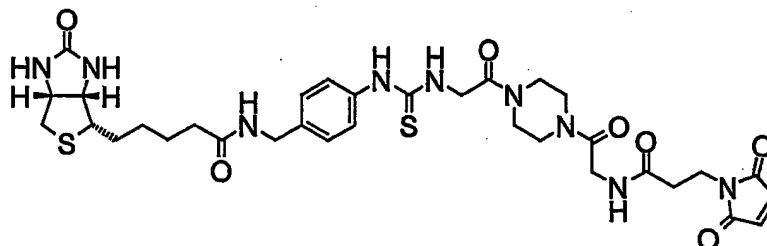


20

Edukte: I.2.4, E.1.1; Variante A

Besonderheiten: Anstelle von Maleimidoessigsäure-N-hydroxysuccinimidester wurde Maleimidopropionsäure mit EDCI/HOBT angeknüpft.

25 **Ausbeute:** 30 % über 4 Stufen

Beispiel 8

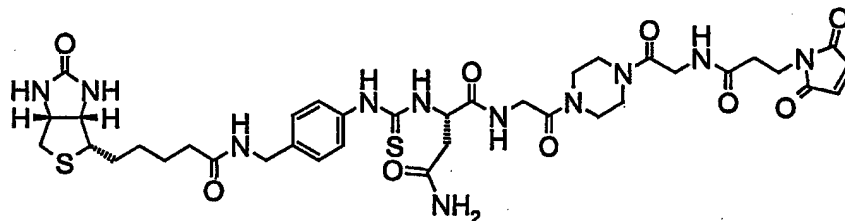
5

Edukte: I.1.1, E.1.1; Variante A

Ausbeute: 70 % über 4 Stufen

 $R_f = 0,53$ ⁵⁾[ESI-MS: $m/e = 742$ ($M+H$)⁺]

10

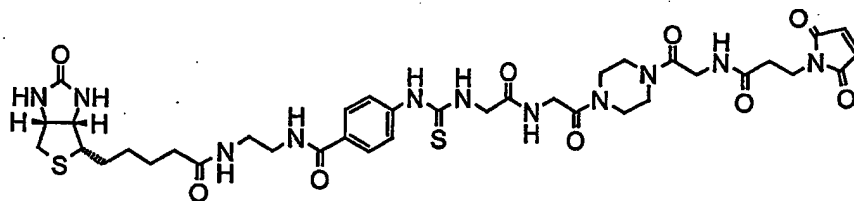
Beispiel 9

15

Edukte: I.2.5, E.1.1; Variante B

Ausbeute: 57 % über 4 Stufen

 $R_f = 0,28$ ⁵⁾[MALDI-MS: $m/e = 878$ ($M+Na$)⁺]

Beispiel 10

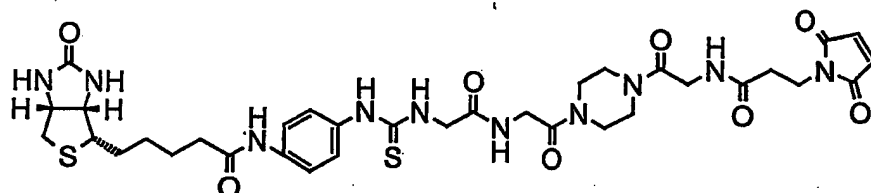
5 Edukte: I.2.1, E.1.3; Variante A

Ausbeute: 34 % über 4 Stufen

$R_f = 0,25$ ⁵⁾

[MALDI-MS: $m/e = 878 (M+Na)^+$]

10 **Beispiel 11**

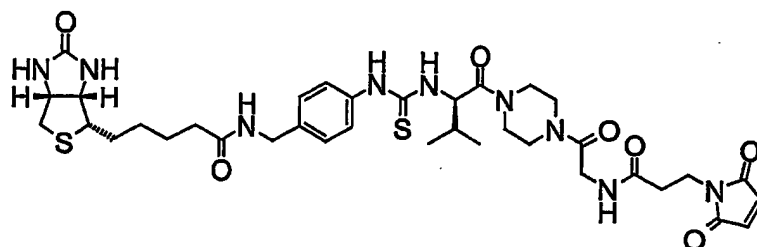


Edukte: I.2.1, E.1.2; Variante A

Ausbeute: 31 % über 4 Stufen

15 $R_f = 0,4$ ⁵⁾

[MALDI-MS: $m/e = 807 (M+Na)^+$]

Beispiel 12

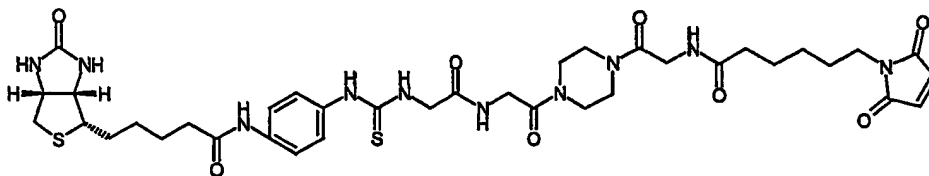
Edukte: I.1.2, E.1.1; Variante A

Ausbeute: 34 % über 4 Stufen

$R_f = 0,38$ ⁴⁾

5 [ESI-MS: $m/e = 784 (M+H)^+$]

Beispiel 13



10

Edukte: I.2.1, E.1.2; Variante B

Besonderheiten: An Stelle der Anknüpfung von Maleimidopropionsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT, wurde hier im letzten Schritt die Amin-Vorstufe des Endproduktes mit ϵ -Maleimidocaprylsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT umgesetzt.

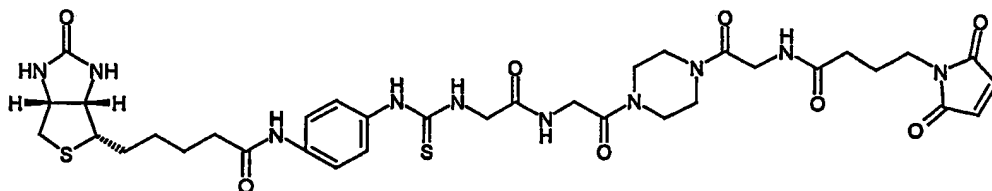
15

Ausbeute: 15 mg (19 % über 4 Stufen)

$R_f = 0,5$ ⁵⁾

20 [ESI-MS: $m/e = 827 (M+H)^+$]

Beispiel 14



25

Edukte: I.2.1, E.1.2; Variante B

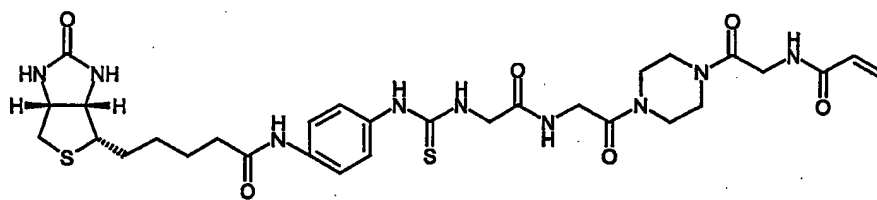
Besonderheiten: An Stelle der Anknüpfung von Maleimidopropionsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT, wurde hier im letzten Schritt die Amin-Vorstufe des Endproduktes mit ϵ -Maleimidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT umgesetzt.

Ausbeute: 12 % über 4 Stufen

$$R_f = 0,5 \text{ } ^5)$$

[ESI-MS: $m/e = 799 (M+H)^+$]

Beispiel 15



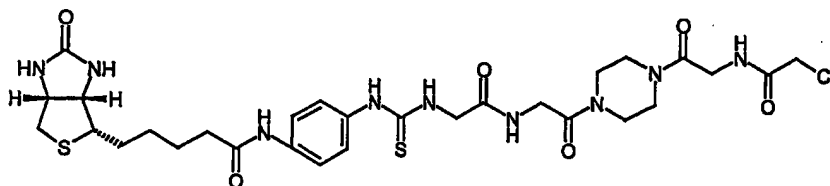
Edukte: I.2.1, E.1.2; Variante B

Besonderheiten: An Stelle der Anknüpfung von Maleimidopropionsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT, wurde hier im letzten Schritt die Amin-Vorstufe des Endproduktes mit Acrylsäurechlorid (6Eq) in Dichlormethan in Gegenwart von 2 Äquivalenten Pyridin umgesetzt. Die entstehende Zielverbindung wurde durch Flash-Chromatographie (Eluent: Acetonitril/Wasser 10/1) gereinigt.

Ausbeute: 3 % über 4 Stufen

$$R_f = 0,15 \text{ } ^4)$$

[ESI-MS: $m/e = 688 (M+H)^+$]

Beispiel 16

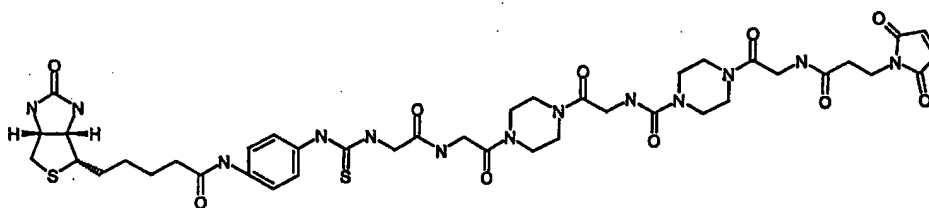
5 Edukte: I.2.1, E.1.2; Variante B

Besonderheiten: An Stelle der Anknüpfung von Maleimidopropionsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT, wurde hier im letzten Schritt die Amin-Vorstufe des Endproduktes mit Chloracetylchlorid in Dichlormethan in Gegenwart von 2 Äquivalenten Pyridin umgesetzt.

Ausbeute: 22 % über 4 Stufen

$R_f = 0,12$ ¹⁾

15 [MALDI-MS: $m/e = 732 (M+Na)^+$]

Beispiel 17

20

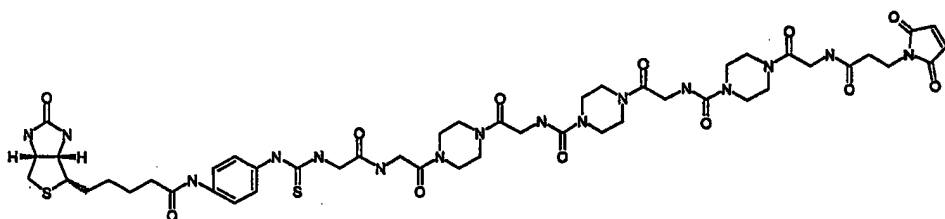
Edukte: I.3.4, E.1.2; Variante B

Ausbeute: 58 % über 4 Stufen

$R_f = 0,2$ ⁵⁾

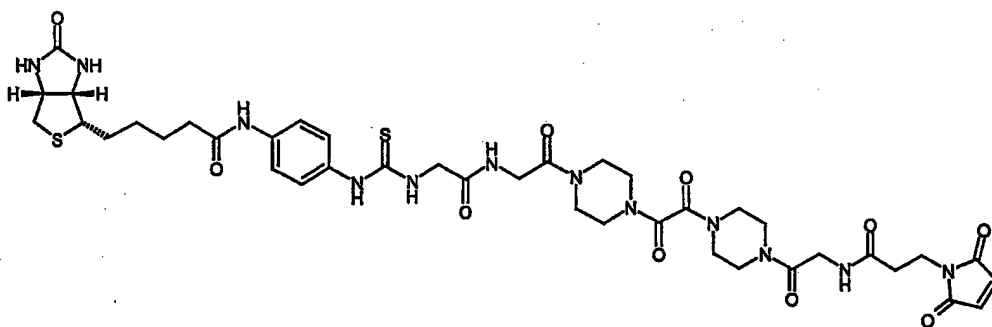
[ESI-MS: $m/e = 954 (M+H)^+$]

25

Beispiel 18

Edukte: I.3.5, E.1.2; Variante B

5

Beispiel 19

Edukte: I.3.1, E.1.2; Variante B

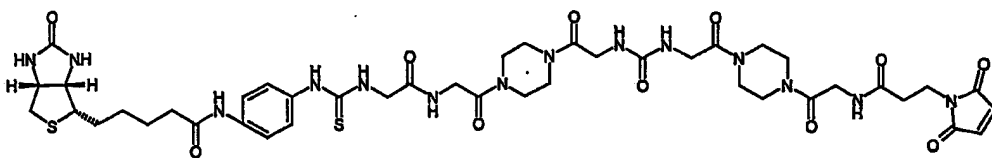
10 Ausbeute: 83 % über 4 Stufen

$R_f = 0,4^5$

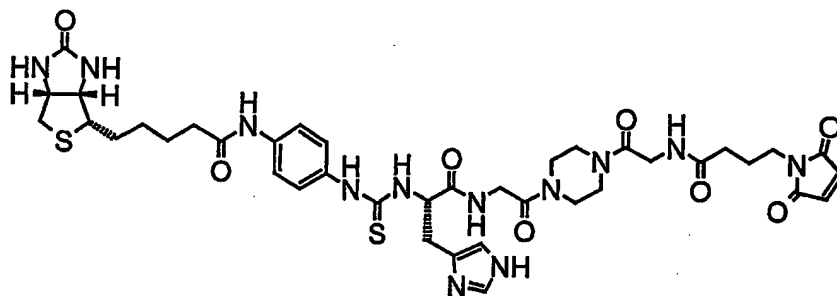
[ESI-MS: $m/e = 925 (M+H)^+$]

Beispiel 20

15

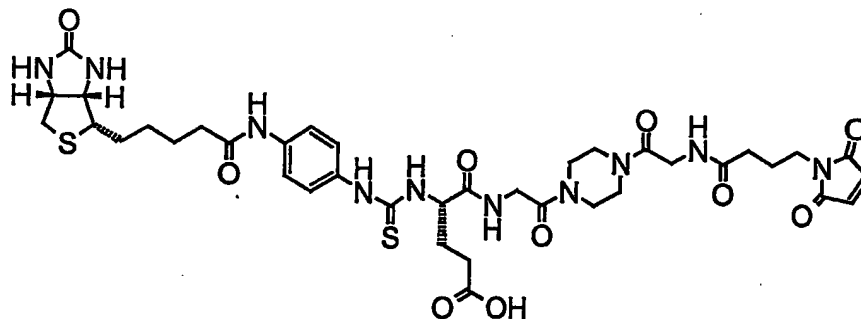


Edukte: I.3.3 E.1.2; Variante B

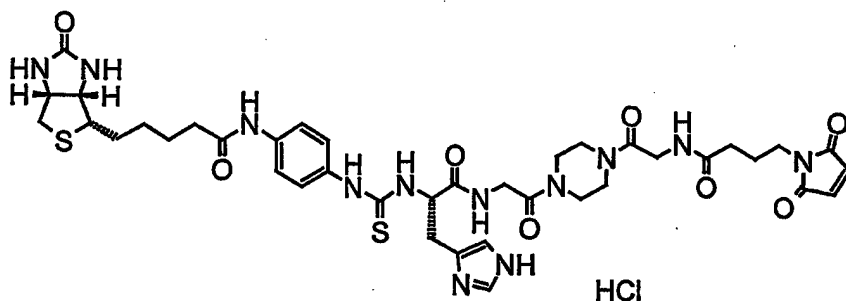
Beispiel 21

- 5 Edukte: I.2.2., E.1.2; Variante B
 Ausbeute: 56 % über 4 Stufen
 $R_f = 0,3$ ⁸⁾
 [ESI-MS: $m/e = 879 (M+H)^+$]

10 **Beispiel 22**



- Edukte: I.2.9., E.1.2; Variante A
15 Ausbeute: 26 % über 4 Stufen
 $R_f = 0,5$ ⁹⁾
 [ESI-MS: $m/e = 871 (M+H)^+$]

Beispiel 23

- 5 Die Herstellung erfolgte durch Überführung der Verbindung aus Beispiel 21 in das Hydrochlorid mit 0,1 M wäßriger HCl.

$R_f = 0,23$ ⁶⁾

[ESI-MS: $m/e = 879 (M+H)^+$]

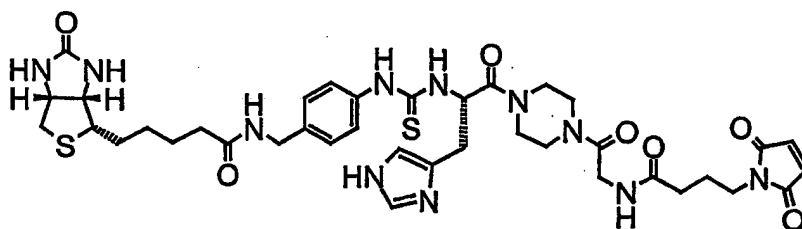
10 **Beispiel 24**

Edukte: I.1.1, E.1.1; Variante B

Ausbeute: 47 % über 4 Stufen

15 $R_f = 0,5$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = 756 (M+H)^+$]

Beispiel 25

20

Edukt: E.2.3, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Verknüpfung mit ω -Maleimidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (61 %),
Boc-Abspaltung (88 %),

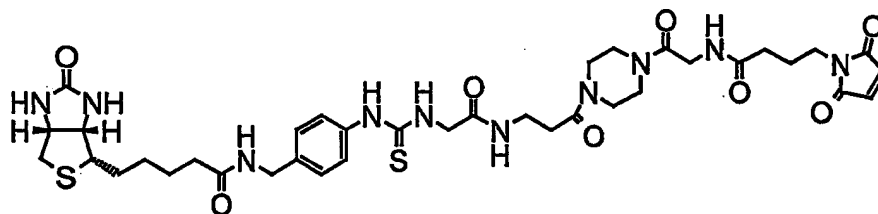
**Verknüpfung mit Bis-Boc-Histidin-N-Hydroxysuccinimidester (52 %),
Boc-Abspaltung (69 %),**

Umsetzung mit E.1.1 (96 %).

$$R_f = 0,4 \text{ } ^6)$$

[ESI-MS: $m/e = 836 (M+H)^+$]

Beispiel 26



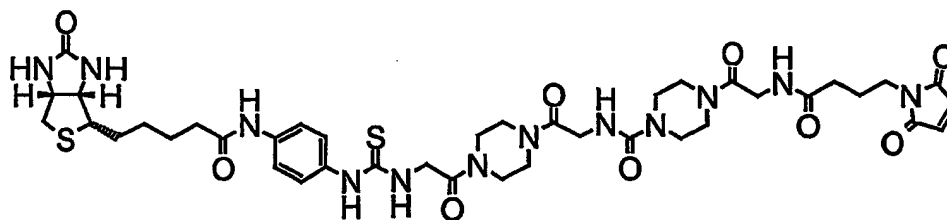
Edukte: I.2.8, E.1.1; Variante B

Ausbeute: 23 % über 4 Stufen

$$R_f = 0,3 \text{ } ^5)$$

[ESI-MS: $m/e = 827 (M+H)^+$]

Beispiel 27



Edukte: I.3.6, E.1.2; Variante B

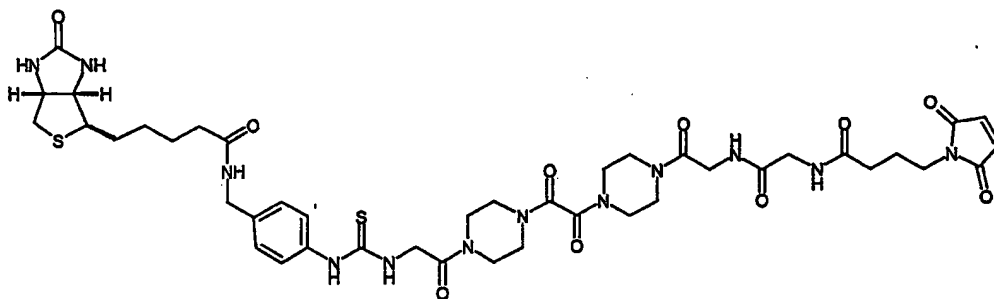
Ausbeute: 27 % über 4 Stufen

$R_f = 0,26$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = 911 (M+H)^+$]

5

Beispiel 28



10

Edukt: I.3.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Verknüpfung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (71 %),

Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (80 %),

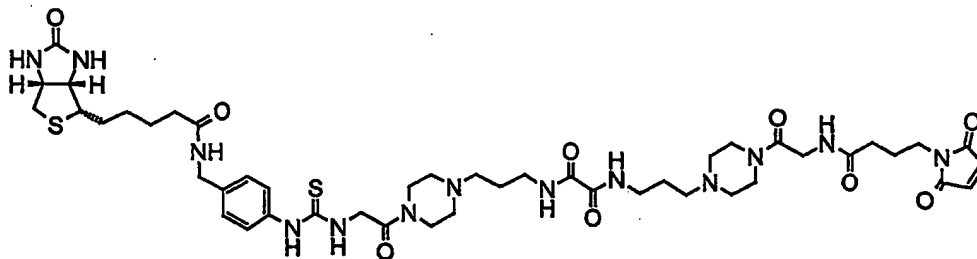
15 Verknüpfung mit E.1.1 (54 %).

$R_f = 0,38$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = 953 (M+H)^+$]

Beispiel 29

20



Edukt: I.3.8, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Boc-Abspaltung an beiden terminalen Aminogruppen mit Trifluoressigsäure (quant.),

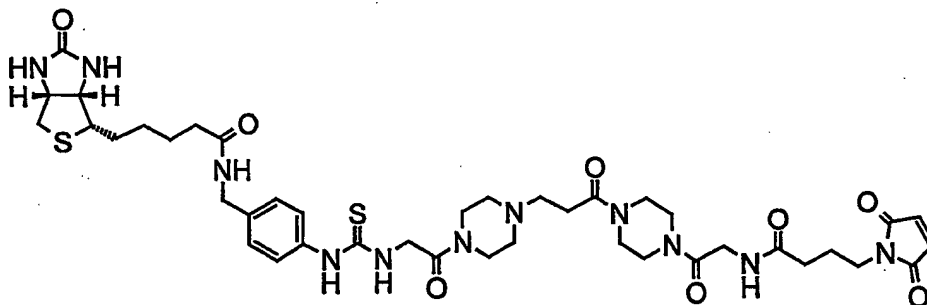
Umsetzung mit ½ Eq. der Verbindung E.1.1 zum Mono-Thioharnstoff (28 %)

5 [R_f = 0,15 ⁹⁾]

Umsetzung mit ω-Maleidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (50 %),

[ESI-MS: m/e = 1010 (M+H)⁺]

10 **Beispiel 30**



Edukt: I.3.12, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

15

Umsetzung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (84 %),

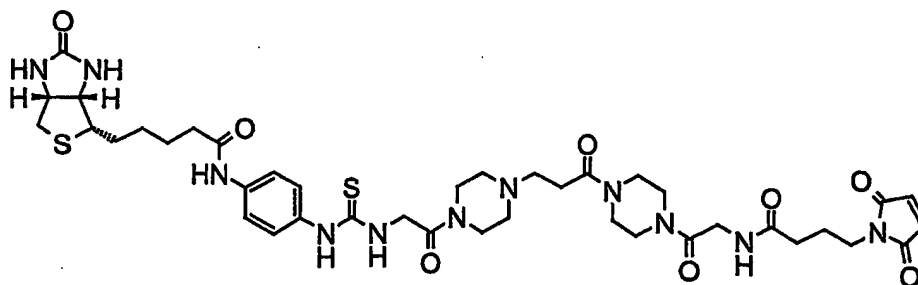
Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (quant.), [R_f = 0,28 ⁸⁾]

Umsetzung mit E.1.1 (60 %), [R_f = 0,46 ⁶⁾]

[ESI-MS: m/e = 896 (M+H)⁺]

20

Beispiel 31



Die Herstellung erfolgte in Analogie zu der Verbindung aus Beispiel 30.

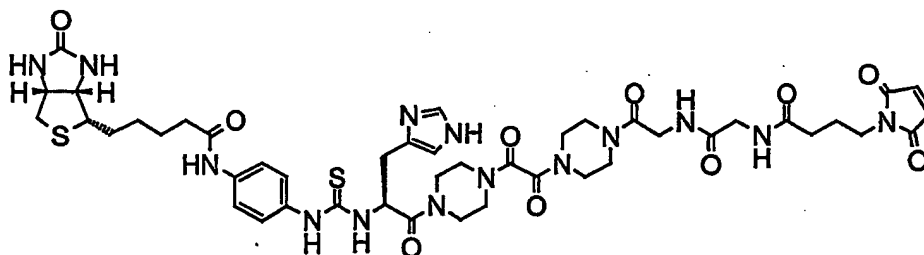
5

Umsetzung mit E.1.2 anstelle von E.1.1 (52 %), $[R_f = 0,55^6]$

[ESI-MS: $m/e = 882 (M+H)^+$]

Beispiel 32

10



Edukt: I.3.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

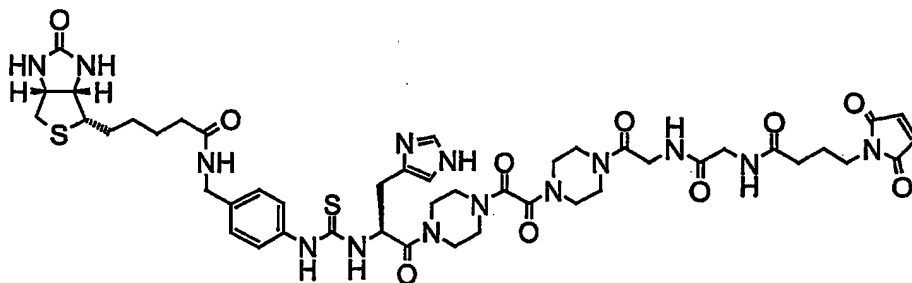
15 Umsetzung mit Bis-Boc-Histidin-N-hydroxysuccinimidester (39 %)

Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (87 %), [$R_f = 0,44$ ⁸]

Umsetzung mit E.1.2 (45 %), [$R_f = 0,44$ ⁶⁾]

[ESI-MS: $m/e = 1019 (M+H)^+$]

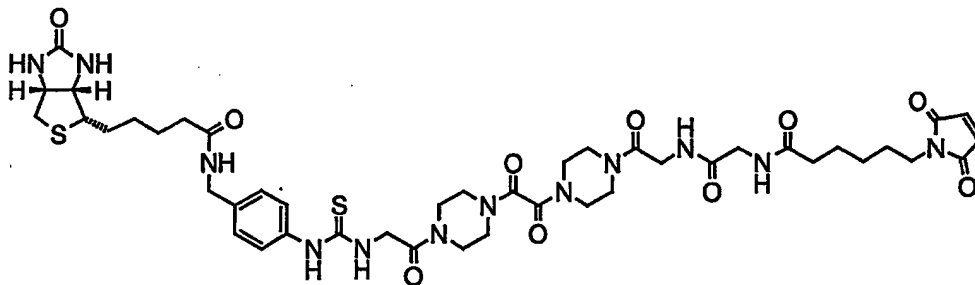
Beispiel 33



5 Die Herstellung erfolgte in Analogie zu der Verbindung aus Beispiel 32.

Umsetzung mit E.1.1 anstelle von E.1.2 (35 %), [$R_f = 0,3$ ⁶⁾]

[ESI-MS: $m/e = 1033 (M+H)^+$]

10 **Beispiel 34**

Edukt: I.3.11, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

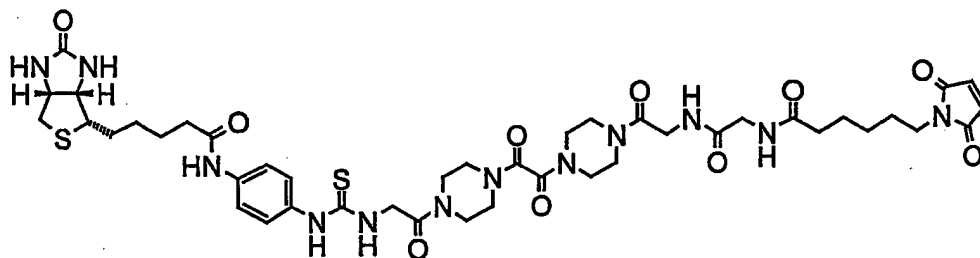
Umsetzung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (60 %)

Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (quant.), [R_f = 0,3 ⁶]

Umsetzung mit E.1.1 (97 %), [$R_f = 0,44$ ⁶⁾]

[ESI-MS: $m/e = 981 (M+H)^+$]

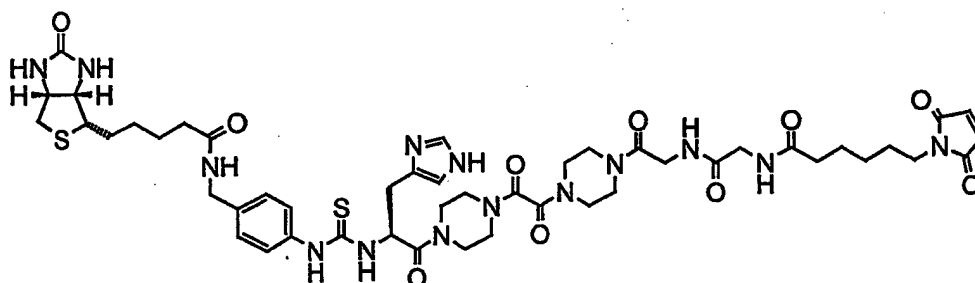
20

Beispiel 35

5 Die Herstellung erfolgte in Analogie zu der Verbindung aus Beispiel 34

Umsetzung mit E.1.2 anstelle von E.1.1 (73 %), [$R_f = 0,48^{5)}$

[ESI-MS: $m/e = 967 (M+H)^+$]

Beispiel 36

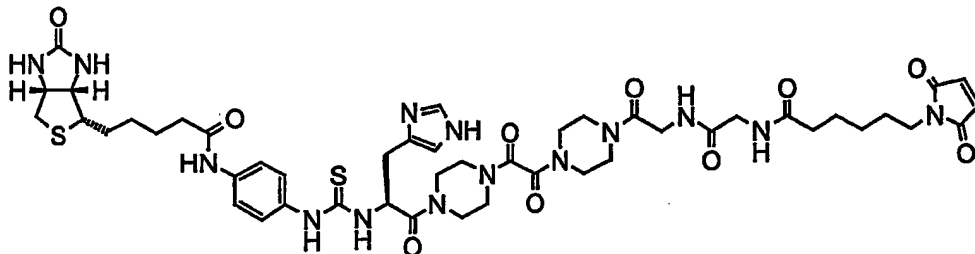
Edukt: I.3.11, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Umsetzung mit Bis-Boc-Histidin-N-hydroxysuccinimidester (41 %)

15 Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (quant.), [$R_f = 0,12^{6)}$

Umsetzung mit E.1.1 (90 %), [$R_f = 0,38^{6)}$

[ESI-MS: $m/e = 1061 (M+H)^+$]

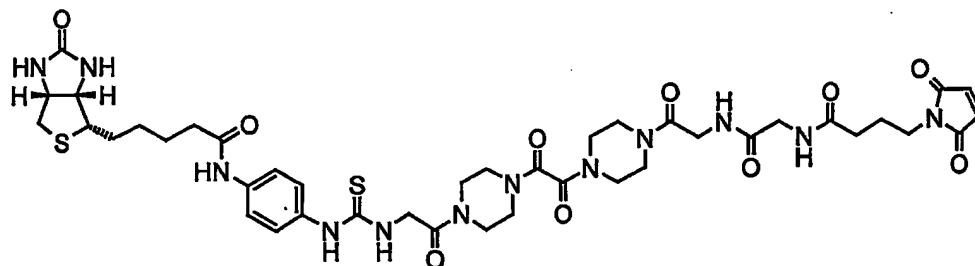
Beispiel 37

5 Die Herstellung erfolgte in Analogie zu der Verbindung aus Beispiel 36.

Umsetzung mit E.1.2 anstelle von E.1.1 (73 %), [$R_f = 0,4$ ⁹⁾

[ESI-MS: $m/e = 1047$ ($M+H$)⁺]

10 **Beispiel 38**



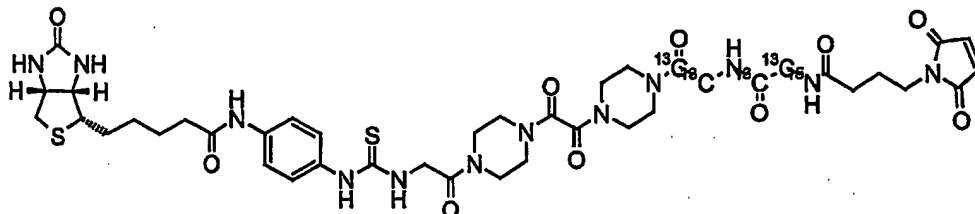
Die Herstellung erfolgte in Analogie zu der Verbindung aus Beispiel 28.

15 Umsetzung mit E.1.2 anstelle von E.1.1 (72 %), [$R_f = 0,45$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = (M+H)$ ⁺]

Dieser Affinitätsmarker bildet zusammen mit den Affinitätsmarkern der Beispiele 39, 40 und 41 ein Affinitätsmarker-Quadruplett, das eine parallele Analyse von vier
20 Proteomproben ermöglicht.

Beispiel 39



5 Edukt: I.3.16, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Verknüpfung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (81 %),

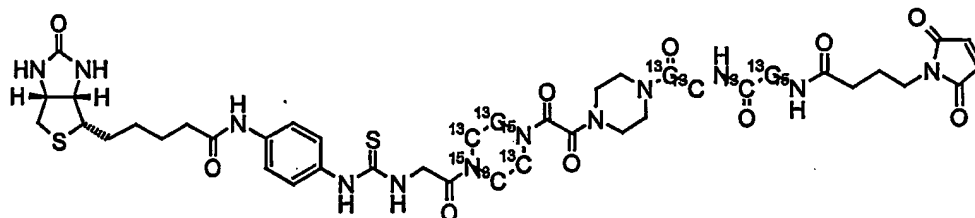
Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (98 %),

Verknüpfung mit E.1.2 (81 %)

10 $R_f = 0,5$ ⁵⁾

[ESI-MS: $m/e = 944 (M+H)^+$]

Beispiel 40



15

Edukt: I.3.17, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

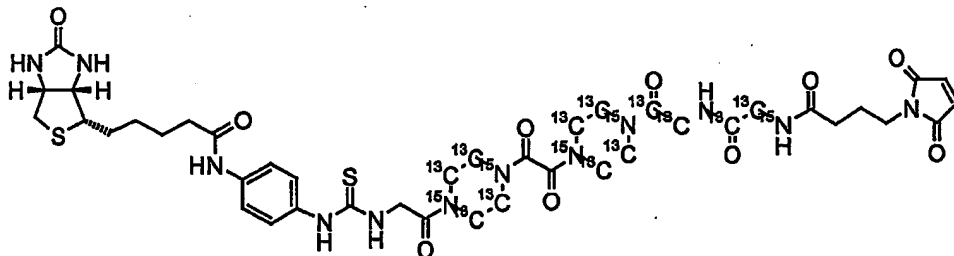
Verknüpfung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (80 %),

20 Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (quant.),

Verknüpfung mit E.1.2 (74 %)

$$R_f = 0,5 \text{ } ^5)$$

[ESI-MS: $m/e = 950 (M+H)^+$]

Beispiel 41

5 Edukt: I.3.18, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

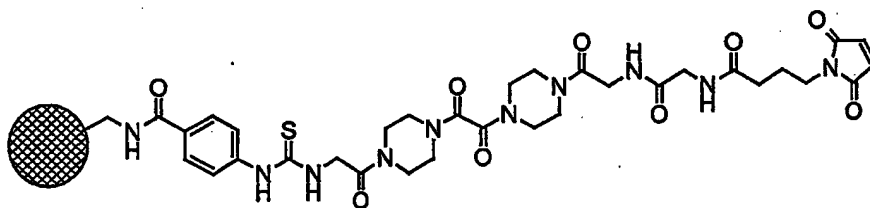
Verknüpfung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (94 %),

Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (98 %),

Verknüpfung mit E.1.2 (38 %)

10 $R_f = 0,5^5$

[ESI-MS: $m/e = 956 (M+H)^+$]

Beispiel 42

15

Edukt I.3.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

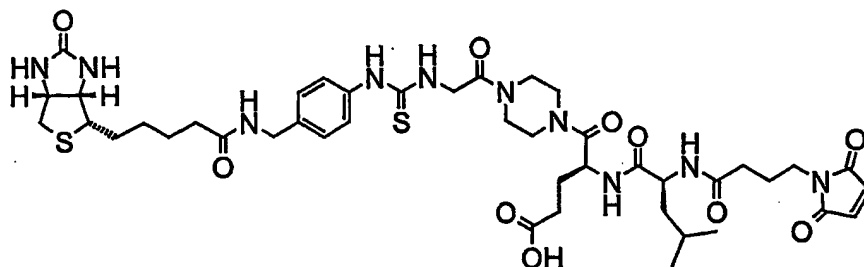
Verknüpfung mit Boc-Glycin-N-carbonsäureanhydrid (78%),

20 Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (93%) [$R_f = 0,2^6$].

Parallel dazu wurden 100 mg (0,026 mmol) NovaSyn TG Resin 01-64-0043 dreimal mit DMF gewaschen. Anschließend gab man 28 mg (0,08 mmol) 4-(Fmoc-amino)-benzoesäure, 30 mg HATU, und 20 mg Diisopropylethylamin in 2 ml DMF zu und

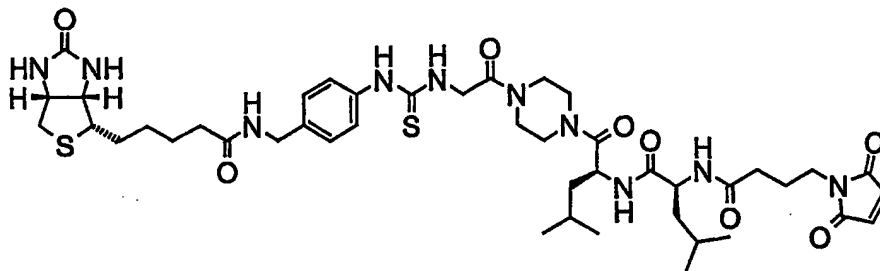
- rührte über Nacht bei RT. Man wusch viermal mit DMF. Anschließend wurde nach Standardbedingungen die Fmoc-Gruppe abgelöst und das Harz viermal mit DMF gewaschen. Man fügte 2 ml Dioxan/Wasser 1/1 und 10 µl Thiophosgen zu. Nach 1 h wurden 200 µl Ethyldiisopropylamin zugegeben und nach wiederum 1 h wurde mit Wasser, Dioxan und DMF gewaschen. 35 mg der zuvor hergestellten Aminkomponente wurden in 2 ml DMF und 25 µl Ethyldiisopropylamin zugegeben. Nach 2 h wurde mit DMF und THF je zweimal gewaschen und getrocknet.

Beispiel 43



Edukt: E.2.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

- Umsetzung mit Z-Glu(tBu)-OSu (33%),
 Hydrierung über Pd-C (92%),
 Umsetzung mit Z-Leu in Gegenwart von EDCI / HOBT (88%),
 Hydrierung über Pd-C (85%),
 Verknüpfung mit ω-Maleimidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (66 %),
 Boc-Abspaltung (88 %),
 Umsetzung mit E.1.1 (88 %).
 $R_f = 0,26$ ⁴⁾
 [ESI-MS: m/e = 941 (M+H)⁺]

Beispiel 44

5 Edukt: E.2.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Umsetzung mit Fmoc-Leu-Leu in Gegenwart von EDCI / HOBT (58%),

Boc-Abspaltung (78 %),

Umsetzung mit E.1.1 (90 %),

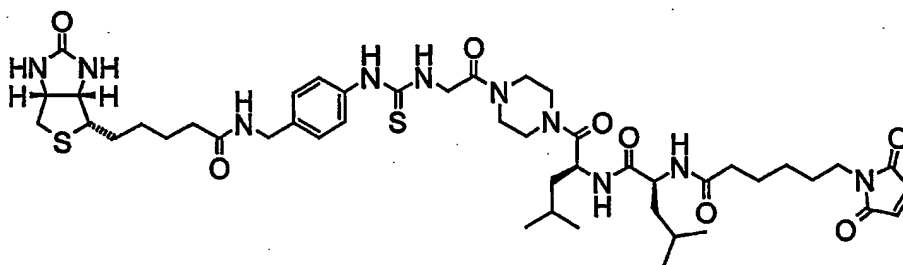
10 Fmoc-Abspaltung mit Piperidin in DMF (68%),

Verknüpfung mit ω -Maleimidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (72 %),

$R_f = 0,68$ ⁵⁾

[FAB-MS: $m/e = 925 (M+H)^+$]

15 **Beispiel 45**

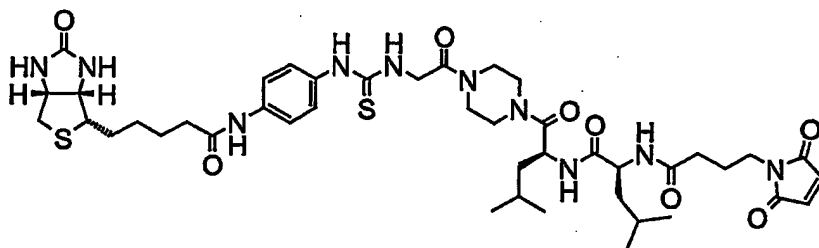


Herstellung analog Beispiel 44; im letzten Schritt erfolgt die Verknüpfung jedoch mit

20 ω -Maleimidocaprylsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (61 %),

$R_f = 0,4$ ⁴⁾

[FAB-MS: $m/e = 953 (M+H)^+$]

Beispiel 46

5

Edukt: E.2.10, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Umsetzung mit Fmoc-Leu-Leu in Gegenwart von EDCI / HOBT (58%),

Boc-Abspaltung (78 %),

10

Umsetzung mit E.1.2 (72 %),

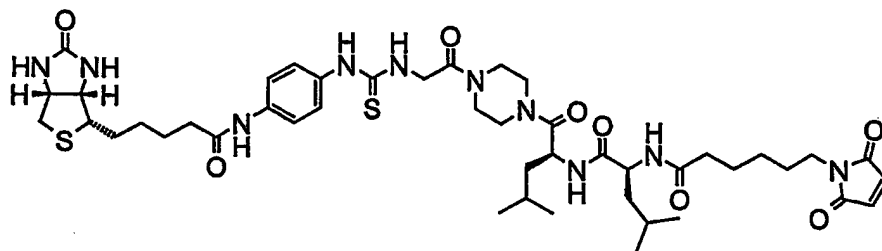
Fmoc-Abspaltung mit Piperidin in DMF (96%),

Verknüpfung mit ω -Maleimidobuttersäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (92 %),

$R_f = 0,4$ ⁴⁾

[ESI-MS: $m/e = 911 (M+H)^+$]

15

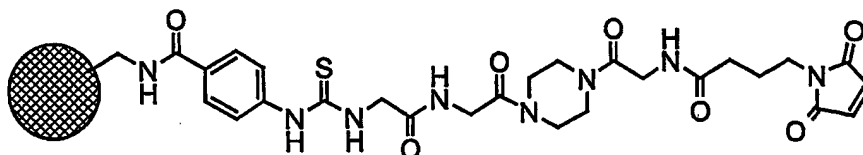
Beispiel 47

20

Herstellung analog Beispiel 46; im letzten Schritt erfolgt die Verknüpfung jedoch mit ω -Maleimidocaprylsäure in Gegenwart von EDCI/HOBT (61 %),

$R_f = 0,5$ ⁴⁾

[FAB-MS: $m/e = 939 (M+H)^+$]

Beispiel 48

5

Edukt I.2.1, dann folgten folgende standardmäßige Umsetzungen:

Boc-Abspaltung mit Trifluoressigsäure (94%) [$R_f = 0,2$ ⁵⁾] Man erhält so die Aminkomponente A.

10

Parallel dazu wurden 42 mg (0,04 mmol) Aminopropyl-Kieselgel (Aldrich, 36425-8, Beladung 0,95 mmol/g) in 2 ml DMF suspendiert und nacheinander mit 45 mg (0,12 mmol) 4-(Fmoc-amino)-phenyllessigsäure, 2 μ l Diisopropylethylamin, 15 mg (0,12 mmol) Diisopropylcarbodiimid und 16 mg (0,12 mmol) HOBT versetzt. Man lässt

15

über Nacht bei RT stehen und wäscht dann viermal mit DMF.

Anschließend wird mit 2 ml 20% Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe abgelöst und das Harz je viermal mit DMF und Dioxan gewaschen.

20

Dann fügt man 1 ml Dioxan und 45 μ l Thiophosgen zu. Nach 1 h werden 900 μ l Ethyldiisopropylamin zugegeben und nach wiederum 1 h wird je dreimal mit Dioxan, DMF und DCM gewaschen.

25

47 mg (0,08 mmol) der zuvor hergestellten Aminkomponente werden in 2 ml DMF und 40 μ l Ethyldiisopropylamin zugegeben. Man lässt über Nacht bei RT stehen und wäscht dann viermal mit DMF.

Erneut wird mit 2 ml 20 % Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe abgelöst und das Harz viermal mit DMF gewaschen.

Man gibt 1 ml DMF zu und anschließend nacheinander 22 mg (0,12 mmol) 4-Maleimido-buttersäure, 15 mg (0,12 mmol) Diisopropylcarbodiimid und 16 mg (0,12 mmol) HOBT und rührt über Nacht bei RT. Anschließend wird je dreimal mit DMF, DCM und THF gewaschen.

5

Proteinanalytische Untersuchungen

Kupplung der Affinitätsmarker an SDS-7 und Beschreibung des Arbeitsablaufs für den Affinitätsmarker aus Beispiel 11

10

Als Probe wurde eine Mischung von sieben Proteinen verwendet, die auch Verwendung als Größenstandard in der Gelelektrophorese findet (SDS-7-Marker, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen).

15

24 µg der Proteinmischung wurden in 5 µl Puffer 1 gelöst und mit 135 µl Puffer 3 verdünnt. Durch Erhitzen auf 100 °C für 3 Minuten wurden die Proteine denaturiert. Zur Reduktion der vorhandenen Cysteine wurde 3 µl Reduktionslösung zugegeben und der Ansatz 10 Minuten bei 100 °C inkubiert. Zur Umsetzung der freien Cysteine mit dem Affinitätsmarker aus Beispiel 11 wurde dann 5 µl Derivatisierungslösung zugesetzt und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

20

Nach der Derivatisierung wurden 3 µl Trypsinlösung zugesetzt. Die Spaltung der Proteine erfolgt über Nacht (ca. 17 Stunden) bei 37 °C.

25

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS

Puffer 2: 10 mM NH₄Acetat, pH 7

Puffer 3: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM EDTA

Reduktionslösung: 50 mM TCEP in Puffer 2

Derivatisierungslösung: 30 µg/µl Affinitätsmarker (Beispiel 11) in DMSO

30

Trypsinlösung: 1 mg/ml Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in Puffer 3

Affinitätsreinigung derivatisierter Peptide

Die Affinitätssäulen (Monomeric Avidin, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) mit einem Säulenvolumen von 200 µl wurden vor der Aufreinigung frisch hergestellt und durch folgende Waschschr

5

- Zwei Säulenvolumina 2xPBS
- Vier Säulenvolumina 30 % (v/v) Acetonitril / 0,4 % (v/v) Trifluoressigsäure
- Sieben Säulenvolumina 2xPBS
- Vier Säulenvolumina 2 mM Biotin in 2xPBS
- Sechs Säulenvolumina 100 mM Glycin, pH 2,8
- Sechs Säulenvolumina 2xPBS

10

30 µl Probe wurden vor dem Auftragen mit 30 µl 2xPBS verdünnt und dann auf die Säule aufgetragen. Danach wurden zum Entfernen der nicht-biotinylierten Peptide folgende Waschschr

15

- Sechs Säulenvolumina 2xPBS
- Sechs Säulenvolumina PBS
- Sechs Säulenvolumina 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat / 20 % (v/v) Methanol
- Ein Säulenvolumen 0,3 % (v/v) Ameisensäure

20

Die Probe wurde mit folgenden Schritten eluiert:

25

- Drei Säulenvolumina 0,3 % (v/v) Ameisensäure
- Drei Säulenvolumina 30 % (v/v) Acetonitril / 0,4 % (v/v) Trifluoressigsäure

Das Eluat wurde bis zur Trockenheit eingedampft und erst kurz vor der Analyse mit Massenspektrometrie wieder gelöst.

30

PBS: Stammlösung 10x, GibcoBRL, Cat. No. 14200-067

Massenspektrometrische Analyse

Zur Analyse der Peptide wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQdeka,
5 ThermoFinnigan, San Jose) eingesetzt, das direkt mit einer Hochdruckflüssig-
keitschromatographie verbunden ist (LC-MS). Als Trennsäule wurde eine Reversed-
Phase-Säule (C₁₈-Phase) benutzt. Die Peptide wurden in Eluent A (0,025 % (v/v)
Trifluoressigsäure) gelöst und injiziert. Sie wurden mit einem Gradienten von Eluent
B (0,025 % (v/v) Trifluoressigsäure / 84 % (v/v) Acetonitril) eluiert. Die eluierenden
10 Peptide wurden durch die Akquisitions-Software des Gerätes automatisch erkannt
und für eine Identifizierung fragmentiert. Damit konnte die Identität der Peptide
eindeutig bestimmt werden.

Fig. 1 zeigt ein Beispiel für ein Fragmentspektrum eines Peptides aus dieser Analyse.
15 Das beobachtete Muster identifiziert das Peptid eindeutig als das Peptid mit der
Sequenz FLDDDLTDDIMCVK aus Lactalbumin, das Bestandteil der Probe war. Die
Masse des Peptides und seine Fragmentierung bestätigen, dass der Affinitätsmarker
in der erwarteten Weise durch Säure gespalten wurde.

20 Insgesamt wurden in einer Analyse 19 unterschiedliche Peptide aus der Probe
identifiziert, die alle in der gleichen Weise die erwartete Masse des Affinitätsmarke-
Restes trugen. Es wurde kein einziges Cystein-haltiges Peptid identifiziert, das einen
noch vollständigen Affinitätsmarker trug.

25 Fig. 1: Fragmentspektrum eines mit der Verbindung aus Beispiel 11 derivatisierten
Peptides nach Isolierung über Avidin, d. h. mit säuregespaltenem
Affinitätsmarker.

**Kupplung der Affinitätsmarker an Proteine und Beschreibung des Arbeits-
30 ablaufs für die Affinitätsmarker der Beispiele 38 bis 41**

Als Probe wurde eine Mischung von sieben Proteinen verwendet, die auch Verwendung als Größenstandard in der Gelelektrophorese findet (SDS-7-Marker, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen). Die beiden zur vergleichenden Proben enthielten folgende Proteine in identischer Menge:

5

Serumalbumin aus Rind

Alpha-Lactalbumin aus Rind

Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne

Trypsin aus Rind

10

Ovalbumin aus Huhn

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Mensch

Carboanhydrase aus Rind

SDS-7

Probe 1 wurde außerdem humanes Interleukin-4 zugegeben, das in Probe 2 nicht vorhanden war.

15

In jeder Probe wurden etwa 240 µg Protein eingesetzt, die sich auf die oben genannten 7 bzw. 8 Proteine in etwa gleich verteilten. Die SDS-7-Proben wurden zunächst in 10 µl Puffer 1 gelöst und mit 95 µl Puffer 3 verdünnt. Dann wurden Probe 1 außerdem 10 µl Interleukin-4-Lösung zugegeben. Die Proben wurden mit Puffer 3 auf 200 µl aufgefüllt und jeweils halbiert (Proben 1a und 1b bzw. 2a und 2b).

20

25

Durch Erhitzen auf 100°C für 3 Minuten wurden die Proteine anschließend denaturiert. Zur Reduktion der vorhandenen Cysteine wurden 3 µl Reduktionslösung zugegeben und die Ansätze 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Zur Umsetzung der freien Cysteine mit den Affinitätsmarkern aus den Beispielen wurden jeder Probe 5 µl Derivatisierungslösung zugesetzt und für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle 4 Proben gemischt und die Hälfte der Gesamtprobe wurde weiterverarbeitet.

30

Probe 1a: Umsetzung mit Beispiel 38

Probe 1b: Umsetzung mit Beispiel 41

Probe 2a: Umsetzung mit Beispiel 39

Probe 2b: Umsetzung mit Beispiel 40

5

Nach erfolgter Umsetzung wurden die Proteine durch Zugabe des vierfachen Volumens von eiskaltem Aceton/Ethanol 1:1 für 15 Minuten bei -20°C gefällt. Das Sediment wurde einmal mit Aceton/Ethanol/Wasser 4:4:2 gewaschen und danach im Vakuum getrocknet. Die Probe wurde in 10 μl Puffer 1 gelöst und mit 260 μl Puffer 3 verdünnt. Zur Spaltung der Proteine wurden 40 μl Trypsinlösung zugegeben und die Probe 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Probe danach kurz auf 95°C erhitzt.

10

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS

15

Puffer 2: 10 mM NH_4Acetat , pH 7

Puffer 3: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM EDTA

Reduktionslösung: 50 mM TCEP in Puffer 2

Derivatisierungslösung: 36 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Affinitätsmarker (Beispiele 38-41) in DMSO

Trypsinlösung: 1 mg/ml Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in Puffer 3

20

Affinitätsreinigung derivatisierter Peptide

25

Zur selektiven Aufreinigung der derivatisierten Peptide aus der Probe wurde eine Affinitätsreinigung mit einer selbst hergestellten Avidin-Säule durchgeführt (Monomeric Avidin, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn). Die Herstellung und die Benutzung der Säule geschah nach den Vorschriften des Herstellers. Die Peptide wurden mit 0,4% Trifluoressigsäure / 30% Acetonitril eluiert.

Massenspektrometrische Analyse

30

Zur Analyse der Peptide wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQdeka, ThermoFinnigan, San Jose) eingesetzt, das direkt mit einer Hochdruckflüssig-

keitschromatographie verbunden ist (LC-MS). Als Trennsäule wurde eine Reversed-Phase-Säule (C₁₈-Phase) benutzt. Die Peptide wurden in Eluent A (0,025 % (v/v) Trifluoressigsäure) gelöst und injiziert. Sie wurden mit einem Gradienten von Eluent B (0,025 % (v/v) Trifluoressigsäure / 84 % (v/v) Acetonitril) eluiert. Die eluierenden Peptide wurden durch die Akquisitions-Software des Gerätes automatisch erkannt und für eine Identifizierung fragmentiert. Damit konnte die Identität der Peptide eindeutig bestimmt werden.

Aufgrund des experimentellen Ansatzes wurden folgende Ergebnisse erwartet:

- Alle Peptide aus der SDS-7-Mischung sollten in Form von vier identisch intensiven Signalen detektiert werden, die in der Chromatographie keinen Isotopeneffekt zeigen.
- Peptide aus Interleukin-4 sollten in Form eines Dubletts von Signalen mit einer Massendifferenz von 17 Da auftreten.

Fig. 2 zeigt die Ionenspuren für die vier unterschiedlich markierten Varianten des Peptids LQGIVSWGSCAQK aus Trypsinogen. Von oben nach unten handelt es sich um das Peptid mit der Markierung durch die Affinitätsmarker mit 0, 5, 11 und 17 Isotopenmarkierungen. Eine Retentionszeitdifferenz zwischen den Varianten ist nicht meßbar. Fig. 3 zeigt das zugehörige MS-Spektrum, das ein Quadruplett von annähernd gleich intensiven Signalen enthält. Die Identität des Peptides wurde durch MS/MS-Experimente bestätigt.

Fig. 4 zeigt die Signale des Peptids NLWGLAGLNSCPVK aus Interleukin-4. Wie erwartet zeigt sich ein Dublett von Signalen mit Intensitätsverhältnis 1:1. Auf diese Weise kann das Signal klar von Peptiden unterschieden werden, die unmarkiert sind und durch unspezifische Adsorption an der Affinitätssäule aufgereinigt wurden. Die Identität des Peptides wurde durch MS/MS-Experimente bestätigt.

Fig. 2: Die Ionenspuren für die m/z -Werte 647,3 Da, 648,9 Da, 650,9 Da und 652,9 Da. Es handelt sich um das dreifach geladene Ion des Peptids LQGIVSWGSGCAQK in den mit den Beispielen 38 bis 41 umgesetzten Formen. Die Identität der Peptide wurde durch MS/MS-Experimente bestätigt.

5

Fig. 3: MS-Spektrum unter dem in Fig. 2 gezeigten LC-Peaks. Es handelt sich um ein dreifach geladenes Peptidion.

10

Fig. 4: MS-Spektrum des dreifach geladenen Ions des Peptids NLWGLAGLNSCPVK aus Interleukin-4. Da es nur in Probe 1 vorhanden war, tritt ein Dublett von Signalen auf, entsprechend dem Peptid mit 0 bzw. 17 Isotopenmarkierungen.

Patentansprüche

1. Organische Verbindung der Formel (I),

5 A-L-PRG (I)

in der

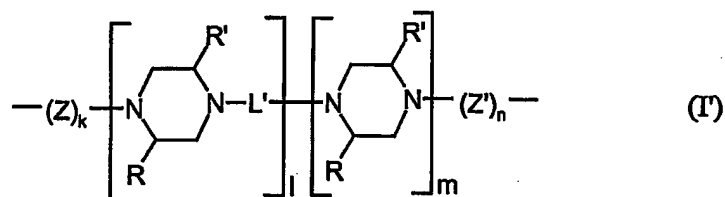
A für einen Affinitätsliganden-Rest oder für eine feste Phase,

10 PRG für eine proteinreaktive Gruppe und

L für einen A und PRG kovalent verknüpfenden Linker steht,

dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L eine Gruppe der Formel (I')
enthält,

15



in der

20 Z der Glycin-Rest NH-CH₂-CO ist,

L' eine Brücke ist, die eine kovalente Verknüpfung zweier Piperazin-Reste ermöglicht oder erleichtert,

25 R und R' an einem Piperazin-Ring unabhängig voneinander und unabhängig von anderen R und R' an anderen Piperazin-Ringen der gleichen oder der anderen der beiden Laufvariablen l und m jeweils eine α-Aminosäure-Seitenkette ist,

Z' der Glycin-Rest $\text{CO-CH}_2\text{-NH}$ ist, der sich von Z in der unterschiedlichen Orientierung unterscheidet, und

5 k, l, m, n unabhängig voneinander jeweils für eine Zahl von 0 bis 10 stehen, wobei die Summe $k + l + m + n$ mindestens 1 und höchstens 40 beträgt,

oder deren Salz.

10

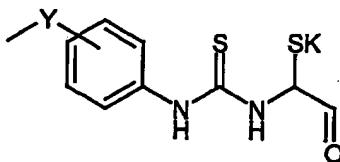
2. Verbindung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L spaltbar ist.

15

3. Verbindung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L eine chemisch, photochemisch, enzymatisch oder thermisch spaltbare funktionelle Gruppe, insbesondere eine säurespaltbare Gruppe, aufweist.

4. Verbindung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L eine säurespaltbare Gruppe S der Formel,

20



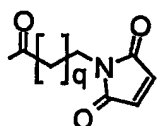
in der

25

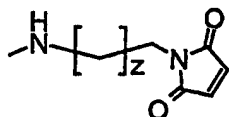
Y für einen Abstandhalter mit 1 bis 10 Nicht-Wasserstoff-Atomen, der die Anbindung des Arylrestes an A ermöglicht oder erleichtert, und

SK für den Rest einer Aminosäure-Seitenkette in der D-oder L- oder in der racemischen Form steht.

5. Verbindung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die säure-spaltbare Gruppe S die Gruppe A mit der Gruppe der Formel (I') verbindet.
- 5 6. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker L aus der säurespaltbaren Gruppe S und der Gruppe der Formel (I') besteht.
- 10 7. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinreaktive Gruppe PRG eine selektive Reaktivität für eine endständige Funktionalität einer Aminosäure, für eine Phosphatgruppe oder für eine möglicherweise vorher generierte Aldehyd- oder Keto-Gruppe im Protein oder für das Reaktionsprodukt einer gezielten Umsetzung des Proteins aufweist.
- 15 8. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die proteinreaktive Gruppe -PRG ausgewählt ist aus

mit $q = 0-4$,

20

mit $z = 0-5$,mit $r = 1-10$ und

25



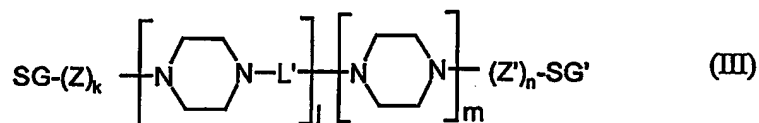
9. Verbindung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass A ein Affinitätsliganden-Rest, bevorzugt der Rest von Biotin,

eines Biotin-Derivats, eines Kohlenhydrats, eines Haptens oder eines Komplexbildners, insbesondere von Biotin oder eines Biotin-Derivats, ist.

10. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
5 dass A eine feste Phase, vorzugsweise ein modifiziertes natürliches oder synthetisches Harz mit zur Anbindung des Linker L geeigneten funktionellen Gruppen, insbesondere ein Amino-funktionalisiertes Harz auf Polyethylen-glycol- oder Kieselgel-Basis, ist.

10 11. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß Anspruch 1, bei dem

i) ein geschütztes Intermediat der Formel (III),



15

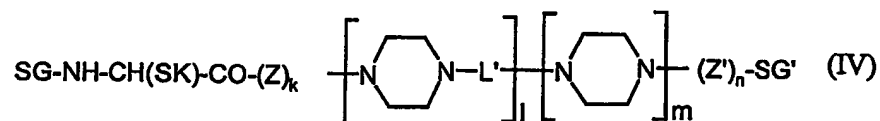
in der SG und SG' für zwei orthogonale Schutzgruppen stehen,

hergestellt wird,

20

ii) aus dem Intermediat der Formel (III) zunächst die Schutzgruppe SG abgelöst wird und anschließend ein weiteres Aminosäurederivat, das eine zu der abgelösten gleiche oder verschiedene Schutzgruppe SG an der α -Aminofunktion trägt, angeknüpft wird, wobei ein Derivat der Formel (IV),

25



in der SK für die Seitenkette einer Aminosäure steht,

erhalten werden,

- 5 iii) nach Ablösung der Schutzgruppe SG' aus dem Derivat der Formel (IV) mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe der Formel (V),

U-PRG (V)

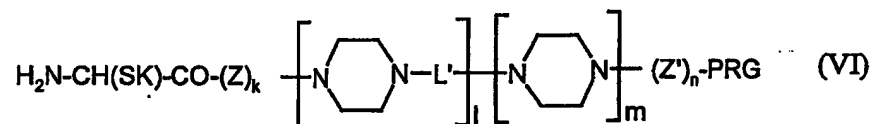
10

in der U für eine Gruppe steht, die die Verknüpfung von PRG mit Z' oder gegebenenfalls mit einer anderen Endgruppe von L ermöglicht,

umgesetzt wird,

15

- iv) die terminale Schutzgruppe SG abgelöst wird, wobei ein Konjugat der Formel (VI)

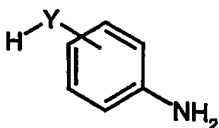


20

erhalten wird,

- v) ein Affinitätsligand A-OH oder A-NH₂ oder eine Hydroxy-, Carboxy- oder Amino-funktionalisierte feste Phase A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form davon mit einer Verbindung der Formel (VII),

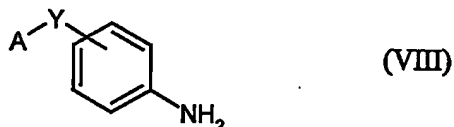
25



(VII),

in der Y für die optional verzweigte Abstandhaltergruppe steht,

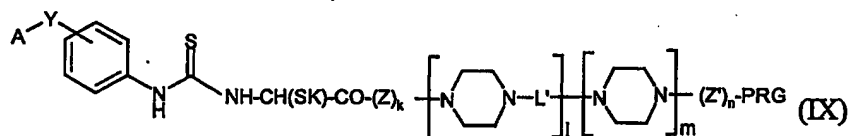
die optional eine Schutzgruppe tragen kann, zum Derivat der Formel (VIII)



umgesetzt wird,

vi) das Derivat der Formel (VIII) dann nach vorheriger Abspaltung einer optional eingeführten Schutzgruppe in ein entsprechendes Isothiocyanat überführt wird,

vii) das Isothiocyanat anschließend mit dem Konjugat der Formel (VI) zum Thioharnstoff der Formel (IX) gekuppelt wird und

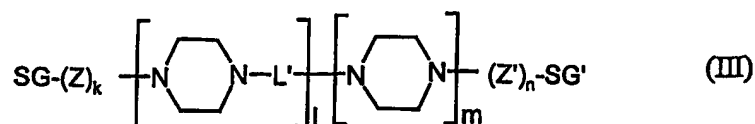


vii) in einem optionalen letzten Schritt gegebenenfalls noch vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden,

wobei die aufeinanderfolgenden Schritte v) und vi) zu einem beliebigen Zeitpunkt vor Schritt vii) durchgeführt werden können.

12. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß Anspruch 1, bei dem

i) ein geschütztes Intermediat der Formel (III),



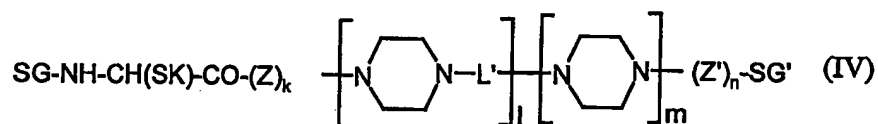
in der SG und SG' für zwei orthogonale Schutzgruppen stehen,

5

hergestellt wird,

- ii) aus dem Intermediat der Formel (III) zunächst die Schutzgruppe SG abgelöst wird und anschließend ein weiteres Aminosäurederivat, das eine zu der abgelösten gleiche oder verschiedene Schutzgruppe SG an der α -Aminofunktion trägt, angeknüpft wird, wobei ein Derivat der Formel (IV),

10



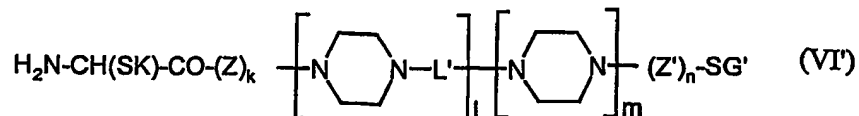
15

in der SK für die Seitenkette einer Aminosäure steht,

erhalten werden,

20

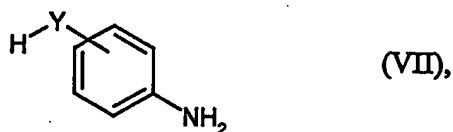
- iii) die terminale Schutzgruppe SG abgelöst wird, wobei ein Konjugat der Formel (VI')



25

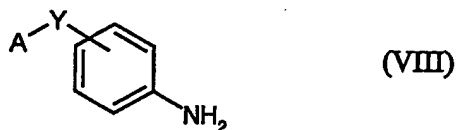
erhalten wird,

- iv) ein Affinitätsligand A-OH oder A-NH₂ oder eine Hydroxy-, Carboxy- oder Amino-funktionalisierte feste Phase A-OH oder A-NH₂ oder eine aktivierte Form davon mit einer Verbindung der Formel (VII),



in der Y für die optional verzweigte Abstandhaltergruppe steht,

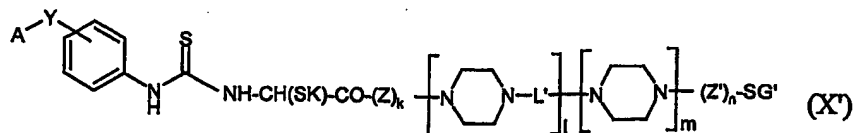
10 die optional eine Schutzgruppe tragen kann, zum Derivat der Formel (VIII)



15 umgesetzt wird,

- v) das Derivat der Formel (VIII) dann nach vorheriger Abspaltung einer optional eingeführten Schutzgruppe in ein entsprechendes Isothiocyanat überführt wird,

- 20 vi) das Isothiocyanat anschließend mit dem Konjugat der Formel (VI') zum Thioharnstoff der Formel (X') gekuppelt wird und



vii) nach Ablösung der Schutzgruppe SG' aus dem Thioharnstoff der Formel (X') mit dem Derivat einer proteinreaktiven Gruppe oder der aktivierten Vorstufe des Derivats einer proteinreaktiven Gruppe der Formel (V),

5

U-PRG (V)

in der U für eine Gruppe steht, die die Verknüpfung von PRG mit Z' oder gegebenenfalls mit einer anderen Endgruppe von L ermöglicht,

10

umgesetzt wird und

viii) in einem optionalen letzten Schritt gegebenenfalls noch vorhandene Schutzgruppen abgespalten werden,

15

wobei die aufeinanderfolgenden Schritte iv) und v) zu einem beliebigen Zeitpunkt vor Schritt vi) durchgeführt werden können.

13. Verwendung einer oder mehrerer unterschiedlich isotoopenmarkierter Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 als Reagenz zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen.

20

14. Verwendung gemäß Anspruch 13 zur Identifikation von einem oder mehreren Proteinen oder Protein-Funktionen in einer oder mehreren Protein-haltigen Proben.

25

15. Verwendung gemäß Anspruch 13 zur Bestimmung der relativen Expressions-Niveaus von einem oder mehreren Proteinen in einer oder mehreren Protein-haltigen Proben.

30

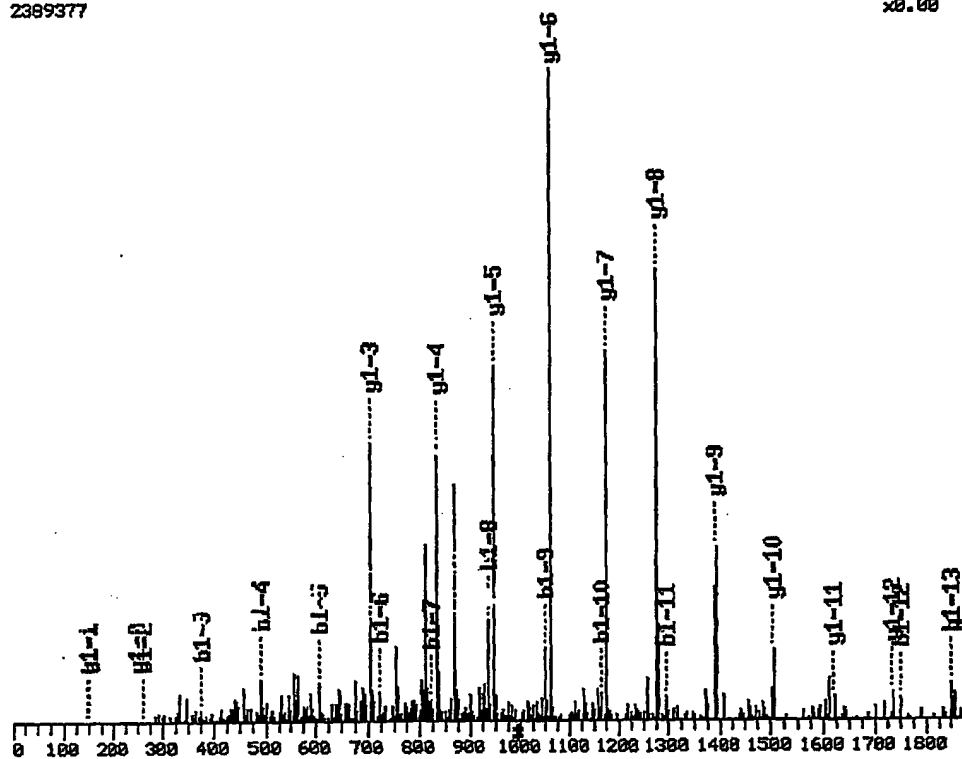
16. Kit zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen, enthaltend als Reagenzien eine oder mehrere unterschiedlich isotoopenmarkierte Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.

- 1/4 -

Fig. 1

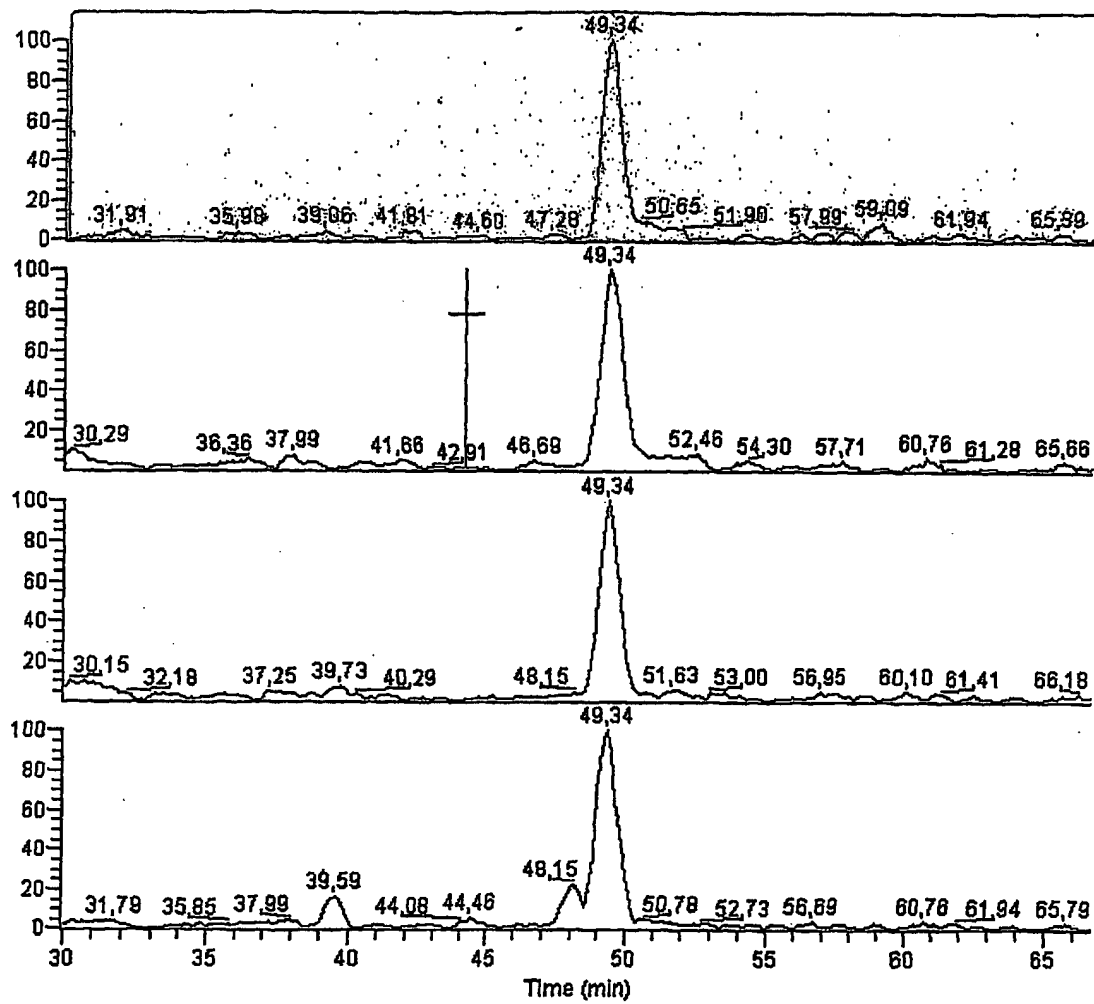
2389377

x0.00



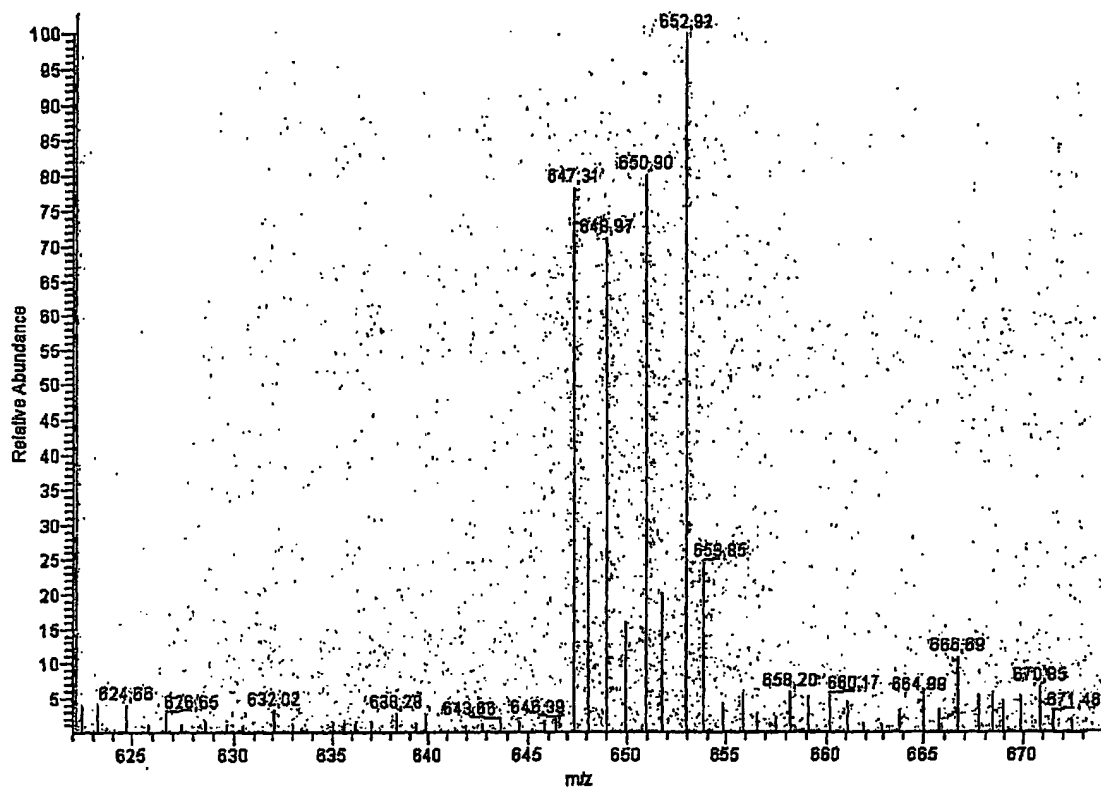
- 2/4 -

Fig. 2



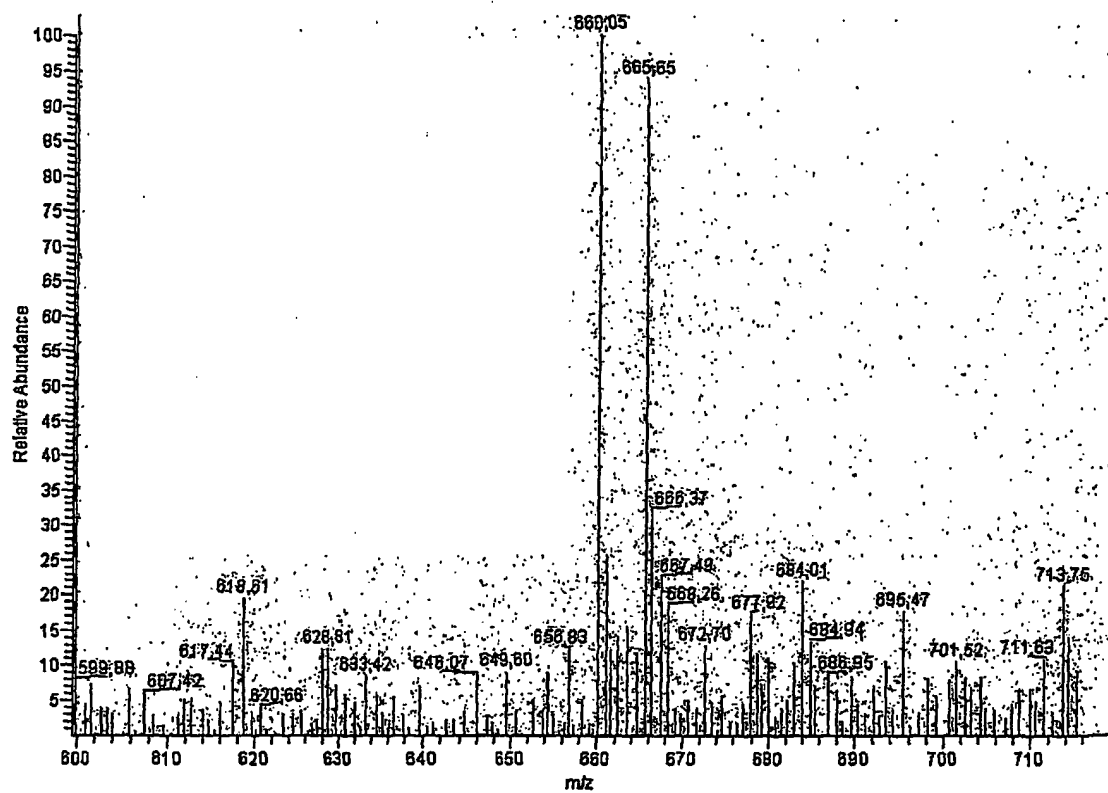
- 3/4 -

Fig. 3



- 4/4 -

Fig. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.